



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : C12N 15/12, 15/62, 15/81 C12P 21/02, C07K 13/00 A61K 37/02, C12N 1/19 // (C12N 1/19, C12R 1:85)		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/15199  (43) Date de publication internationale: 5 août 1993 (05.08.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00085  (22) Date de dépôt international: 28 janvier 1993 (28.01.93)		(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).	
(30) Données relatives à la priorité: 92/01064 31 janvier 1992 (31.01.92) FR		(81) Etats désignés: CA, FI, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): FLEER, Reinhard [DE/FR]; 47, avenue Beauséjour, F-91440 Bures-sur-Yvette (FR). FOURNIER, Alain [FR/FR]; 28, avenue Roger-Salengro, F-92000 Châtenay-Malabry (FR). GUILTON, Jean-Dominique [FR/FR]; 74, rue Dunois, F-75013 Paris (FR). JUNG, Gérard [FR/FR]; 12, rue des Grands-Jardins, Leuville-sur-Orge, F-91310 Montlhéry (FR). YEH, Patrice [FR/FR]; 11 bis, rue Lacépède, F-75005 Paris (FR).			
(54) Title: NOVEL BIOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDES, PREPARATION THEREOF AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAID POLYPEPTIDES			
(54) Titre: NOUVEAUX POLYPEPTIDES BIOLOGIQUEMENT ACTIFS, LEUR PRÉPARATION ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LES CONTENANT			
(57) Abstract			
Novel biologically active polypeptides, preparation thereof and pharmaceutical compositions containing said polypeptides.			
(57) Abrégé			
La présente invention concerne de nouveaux polypeptides biologiquement actifs, leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant.			

*UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures  
publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

NOUVEAUX POLYPEPTIDES BIOLOGIQUEMENT ACTIFS.  
LEUR PREPARATION ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LES  
CONTENANT

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides biologiquement actifs, leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant.

Plus particulièrement, la présente invention concerne des polypeptides recombinants essentiellement composés d'une partie active dérivée d'un polypeptide, naturel ou artificiel, ayant une activité thérapeutique, et couplé à une albumine ou à un variant de l'albumine. Il est entendu que l'activité thérapeutique des polypeptides de l'invention peut être soit directe (traitement des maladies), ou indirecte (et par exemple utilisable dans la prévention des maladies, dans la conception des vaccins, dans les techniques de l'imagerie médicale etc...).

Il est entendu dans ce qui suit que les variants de l'albumine désignent toute protéine à haute demi-vie plasmatique obtenue par modification (mutation, délétion et/ou addition) par les techniques du génie génétique d'un gène codant pour un isomorphe donné de la sérum-albumine humaine, ainsi que toute macromolécule à haute demi-vie plasmatique obtenue par modification *in vitro* de la protéine codée par de tels gènes. L'albumine étant très polymorphe, de nombreux variants naturels ont été identifiés et répertoriés [Weitkamp L.R. et al., Ann. Hum. Genet. 37 (1973) 219].

Le but de la présente invention est d'élaborer des protéines artificielles biologiquement actives et utilisables sur le plan pharmaceutique. En effet, de nombreux polypeptides possédant une ou plusieurs activités thérapeutiques potentielles ne peuvent être exploités pharmaceutiquement. Ceci peut avoir différentes raisons, telles que notamment leur faible stabilité *in vivo*, leur structure complexe ou fragile, la difficulté de les produire à une échelle industriellement acceptable, etc... De même, certains polypeptides ne donnent pas les résultats attendus *in vivo* en raison de problèmes d'administration, de conditionnement, de pharmacocinétique etc...

La présente invention permet de remédier à ces inconvénients. La présente invention fournit en effet de nouvelles molécules permettant une exploitation optimale sur le plan thérapeutique des propriétés biologiques de ces polypeptides. La

présente invention résulte notamment de la mise en évidence qu'il est possible de coupler génétiquement toute structure active dérivée d'un polypeptide biologiquement actif à une autre structure protéique constituée d'albumine, sans en altérer lesdites propriétés biologiques. Elle résulte également de la mise en évidence 5 par la demanderesse que la sérum-albumine humaine permet de présenter efficacement la structure active à ses sites d'interaction, et qu'elle assure une stabilité plasmatique élevée du polypeptide de l'invention. Les polypeptides de l'invention permettent ainsi de maintenir dans l'organisme une activité biologique donnée pendant un temps prolongé. Ils permettent ainsi de réduire les doses administrées et, 10 dans certains cas, de potentialiser l'effet thérapeutique, par exemple en réduisant les effets secondaires consécutifs à une administration plus importante. Les polypeptides de l'invention permettent de plus de générer et d'utiliser des structures dérivées des polypeptides biologiquement actifs très petites et donc très spécifiques d'un effet recherché. Il est entendu que les peptides ayant une activité biologique présentant un 15 intérêt thérapeutique peuvent également correspondre à des séquences peptidiques non naturelles, isolées par exemple à partir de banques peptidiques aléatoires. Les polypeptides de l'invention possèdent par ailleurs une répartition particulièrement avantageuse dans l'organisme, ce qui modifie leurs propriétés pharmacocinétiques et favorise le développement de leur activité biologique et leur utilisation. En outre, ils 20 présentent également l'avantage d'être faiblement ou non-immunogéniques pour l'organisme dans lequel ils sont utilisés. Finalement, les polypeptides de l'invention peuvent être exprimés (et préférentiellement sécrétés) par des organismes recombinants, à des niveaux permettant leurs exploitation industrielle.

Un objet de la présente invention concerne donc des polypeptides 25 comportant une partie active dérivée d'un polypeptide ayant une activité thérapeutique, couplée à une albumine ou à un variant de l'albumine.

Dans un mode de réalisation particulier, les peptides possédant une activité thérapeutique ne sont pas d'origine humaine. Par exemple on peut citer des peptides, 30 ou leurs dérivés, possédant des propriétés potentiellement utiles dans les pathologies des compartiments sanguins et interstitiels, tels que l'hirudine, la trigramine, l'antistatine, les peptides anticoagulant des tiques (TAP), l'ariétine, l'applagine etc....

Plus particulièrement, dans les molécules de l'invention, le polypeptide ayant une activité thérapeutique est un polypeptide d'origine humaine ou un variant moléculaire. Par exemple, il peut s'agir de tout ou partie, d'un enzyme, d'un inhibiteur d'enzyme, d'un antigène, d'un anticorps, d'une hormone, d'un facteur intervenant dans le contrôle de la coagulation, d'un interféron, d'une cytokine [les interleukines, mais aussi leurs variants antagonistes naturels de leur fixation au(x) récepteur(s), les cytokines de type SIS (small induced secreted) et par exemple les protéines inflammatoires des macrophages (les MIPs), etc...], d'un facteur de croissance et/ou de différenciation [et par exemple les facteurs de croissance transformants (les TGFs), les facteurs de différenciation des cellules sanguines (érythropoïétine, M-CSF, G-CSF, GM-CSF etc..), l'insuline et les facteurs de croissance qui lui ressemblent (les IGFs), ou encore les facteurs de perméabilité cellulaire (VPF/VEGF), etc..], d'un facteur impliqué dans la génèse/résorption des tissus osseux (OIF et ostéospontine par exemple), d'un facteur impliqué dans la motilité ou la migration cellulaire [et par exemple le facteur de motilité autocrine (AMF), le facteur de stimulation de la migration (MSF), ou encore le facteur de dispersion (scatter factor/facteur de croissance des hépatocytes)], d'un facteur bactéricide ou antifongique, d'un facteur chimiotactique [et par exemple le facteur plaquettaire 4 (PF4), ou encore les peptides chemoattractants des monocytes (MCP/MCAF) ou des neutrophiles (NCAF), etc...], d'un facteur cytostatique (et par exemple les protéines qui se fixent aux galactosides), d'une molécule adhésive plasmatique (et par exemple le facteur de von Willebrand, le fibrinogène etc...) ou interstitielle (laminine, ténascine, vitronectine, etc...) ou des matrices extracellulaires, ou encore toute séquence peptidique antagoniste ou agoniste d'interactions moléculaires et/ou intercellulaires impliquées dans les pathologies des compartiments circulatoires et interstitiels et par exemple la formation des thrombus artériels et veineux, les métastases cancéreuses, l'angiogénèse tumorale, le choc inflammatoire, les maladies autoimmunes, les pathologies osseuses et ostéo-articulaires etc...]

La partie active des polypeptides de l'invention peut être constituée, par exemple, par le polypeptide ayant une activité thérapeutique entier, ou par une structure dérivée de celui-ci, ou encore par un polypeptide non naturel isolé à partir d'une banque peptidique. Au sens de la présente invention, on entend par structure dérivée tout polypeptide obtenu par modification et conservant une activité

thérapeutique. Par modification, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou modification de nature génétique et/ou chimique. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité de la molécule pour ses sites de fixation, celui d'améliorer ses 5 niveaux de production, celui d'augmenter sa résistances aux protéases, celui d'augmenter son efficacité thérapeutique ou encore de réduire ses effets secondaires, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés biologiques. A titre d'exemple, les polypeptides chimères de l'invention possèdent des propriétés pharmacocinétiques et une activité biologique utilisable pour la prévention ou le traitement des maladies.

10 Des polypeptides de l'invention particulièrement avantageux sont ceux dans lesquels la partie active présente :

- (a) la structure peptidique entière ou,
- (b) une structure dérivée de (a) par modification structurale (mutation, substitution addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus) et possédant une 15 activité thérapeutique.

10 Parmi les structures du type (b), on peut citer plus particulièrement les molécules dans lesquelles certains sites de N- ou O-glycosylation ont été modifiés ou supprimés, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, ou les molécules dans lesquelles tous les résidus cystéine ont été substitués. On peut 20 citer également des molécules obtenues à partir de (a) par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés, ou exprimant une activité indésirable, et des molécules comportant par rapport à (a) des résidus supplémentaires, tels que par exemple une méthionine N-terminale et/ou un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction.

25 La partie active des molécules de l'invention peut être couplée soit directement soit par l'intermédiaire d'un peptide artificiel à l'albumine. De plus, elle peut constituer l'extrémité N-terminale comme l'extrémité C-terminale de la molécule. Préférentiellement, dans les molécules de l'invention, la partie active 30 constitue la partie C-terminale de la chimère. Il est également entendu que la partie biologiquement active peut être redondante au sein de la chimère. Une représentation schématique des molécules de l'invention est donnée à la Figure 1.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de préparation des molécules chimères décrites ci-avant. Plus précisément, ce procédé consiste à faire exprimer par un hôte cellulaire eucaryote ou procaryote une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide désiré, puis à récolter le polypeptide produit.

5 Parmi les hôtes eucaryotes utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia, Schwanniomyces, ou Hansenula. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, Cl27, etc... Parmi les champignons  
10 susceptibles d'être utilisés dans la présente invention, on peut citer plus particulièrement Aspergillus ssp. ou Trichoderma ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries telles que Escherichia coli, ou appartenant aux genres Corynebacterium, Bacillus, ou Streptomyces.

15 Les séquences nucléotidiques utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être préparées de différentes manières. Généralement, elles sont obtenues en assemblant en phase de lecture les séquences codant pour chacune des parties fonctionnelles du polypeptide. Celles-ci peuvent être isolées par les techniques de l'homme de l'art, et par exemple directement à partir des ARN messagers (ARNm) cellulaires, ou par réclonage à partir d'une banque d'ADN  
20 complémentaire (ADNc), ou encore il peut s'agir de séquences nucléotidiques totalement synthétiques. Il est entendu de plus que les séquences nucléotidiques peuvent également être ultérieurement modifiées, par exemple par les techniques du génie génétique, pour obtenir des dérivés ou des variants desdites séquences.

25 Plus préférentiellement, dans le procédé de l'invention, la séquence nucléotidique fait partie d'une cassette d'expression comprenant une région d'initiation de la transcription (région promoteur) permettant, dans les cellules hôtes, l'expression de la séquence nucléotidique placée sous son contrôle et codant pour les polypeptides de l'invention. Cette région peut provenir de régions promoteurs de gènes fortement exprimés dans la cellule hôte utilisée, l'expression étant constitutive  
30 ou régulable. S'agissant de levures, il peut s'agir du promoteur du gène de la phosphoglycérate kinase (PGK), de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GPD), de la lactase (LAC4), des énolases (ENO), des alcools deshydrogénases (ADH), etc... S'agissant de bactéries, il peut s'agir du promoteur des gènes droit ou gauche du bactériophage lambda (PL, PR), ou encore des promoteurs des gènes des

opérons tryptophane ( $P_{trp}$ ) ou lactose ( $P_{lac}$ ). En outre, cette région de contrôle peut être modifiée, par exemple par mutagénèse *in vitro*, par introduction d'éléments additionnels de contrôle ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels de contrôle. La cassette d'expression peut 5 également comprendre une région de terminaison de la transcription fonctionnelle dans l'hôte envisagé, positionnée immédiatement en aval de la séquence nucléotidique codant pour un polypeptide de l'invention.

Dans un mode préféré, les polypeptides de l'invention résultent de l'expression dans un hôte eucaryote ou procaryote d'une séquence nucléotidique et de 10 la sécrétion du produit d'expression de ladite séquence dans le milieu de culture. Il est en effet particulièrement avantageux de pouvoir obtenir par voie recombinante des molécules directement dans le milieu de culture. Dans ce cas, la séquence nucléotidique codant pour un polypeptide de l'invention est précédée d'une séquence "leader" (ou séquence signal) dirigeant le polypeptide naissant dans les voies de 15 sécrétion de l'hôte utilisé. Cette séquence "leader" peut être la séquence signal naturelle du polypeptide biologiquement actif dans le cas où celui-ci est une protéine naturellement sécrétée, ou celle de la structure stabilisatrice, mais il peut également s'agir de toute autre séquence "leader" fonctionnelle, ou d'une séquence "leader" 20 artificielle. Le choix de l'une ou l'autre de ces séquences est notamment guidé par l'hôte utilisé. Des exemples de séquences signal fonctionnelles incluent celles des gènes des phéromones sexuelles ou des toxines "killer" de levures.

En plus de la cassette d'expression, un ou plusieurs marqueurs permettant de 25 sélectionner l'hôte recombiné peuvent être additionnés, tels que par exemple le gène URA3 de la levure S. cerevisiae, ou des gènes conférant la résistance à des antibiotiques comme la génétidine (G418) ou à tout autre composé toxique comme certains ions métalliques.

L'ensemble constitué par la cassette d'expression et par le marqueur de sélection peut être introduit directement dans les cellules hôtes considérées, soit 30 inséré préalablement dans un vecteur autoréplicatif fonctionnel. Dans le premier cas, des séquences homologues à des régions présentes dans le génome des cellules hôtes sont préférentiellement additionnées à cet ensemble; lesdites séquences étant alors positionnées de chaque côté de la cassette d'expression et du gène de sélection de façon à augmenter la fréquence d'intégration de l'ensemble dans le génome de l'hôte

en ciblant l'intégration des séquences par recombinaison homologue. Dans le cas où la cassette d'expression est insérée dans un système réplicatif, un système de réplication préféré pour les levures du genre Kluyveromyces est dérivé du plasmide pKD1 initialement isolé de K.drosophilaram; un système préféré de réplication pour les levures du genre Saccharomyces est dérivé du plasmide 2 $\mu$  de S. cerevisiae. De plus, ce plasmide d'expression peut contenir tout ou partie desdits systèmes de réplication, ou peut combiner des éléments dérivés du plasmide pKD1 aussi bien que du plasmide 2 $\mu$ .

En outre, les plasmides d'expression peuvent être des vecteurs navettes entre un hôte bactérien tel que Escherichia coli et la cellule hôte choisie. Dans ce cas, une origine de réplication et un marqueur de sélection fonctionnant dans l'hôte bactérien sont requises. Il est également possible de positionner des sites de restriction entourant les séquences bactériennes et uniques sur le vecteur d'expression: ceci permet de supprimer ces séquences par coupure et religature *in vitro* du vecteur tronqué avant transformation des cellules hôtes, ce qui peut résulter en une augmentation du nombre de copies et en une stabilité accrue des plasmides d'expression dans lesdits hôtes. Par exemple, de tels sites de restriction peuvent correspondre aux séquences telles que 5'-GGCCNNNNNGGCC-3' (SfiI) ou 5'-GCGGCCGC-3' (NotI) dans la mesure où ces sites sont extrêmement rares et généralement absents d'un vecteur d'expression.

Après construction de tels vecteurs ou cassette d'expression, ceux-ci sont introduits dans les cellules hôtes retenues selon les techniques classiques décrites dans la littérature. A cet égard, toute méthode permettant d'introduire un ADN étranger dans une cellule peut être utilisée. Il peut s'agir notamment de transformation, électroporation, conjugaison, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art. A titre d'exemple pour les hôtes de type levure, les différentes souches de Kluyveromyces utilisées ont été transformées en traitant les cellules entières en présence d'acétate de lithium et de polyéthylène glycol, selon la technique décrite par Ito et al. [J. Bacteriol. 153 (1983) 163]. La technique de transformation décrite par Durrens et al. [Curr. Genet. 18 (1990) 7] utilisant l'éthylène glycol et le diméthylsulfoxyde a également été utilisée. Il est aussi possible de transformer les levures par électroporation, selon la méthode décrite par Karube et al. [FEBS Letters 182 (1985) 90]. Un protocole alternatif est également décrit en détail dans les exemples qui suivent.

Après sélection des cellules transformées, les cellules exprimant lesdits polypeptides sont inoculées et la récupération desdits polypeptides peut être faite, soit au cours de la croissance cellulaire pour les procédés "en continu", soit en fin de croissance pour les cultures "en lots" ("batch"). Les polypeptides qui font l'objet de la 5 présente invention sont ensuite purifiés à partir du surnageant de culture en vue de leur caractérisation moléculaire, pharmacocinétique et biologique.

Un système d'expression préféré des polypeptides de l'invention consiste en l'utilisation des levures du genre Kluyveromyces comme cellule hôte, transformées par certains vecteurs dérivés du réplicon extrachromosomique pKD1 initialement 10 isolé chez K. marxianus var. drosophilic. Ces levures, et en particulier K. lactis et K. fragilis sont généralement capables de répliquer lesdits vecteurs de façon stable et possèdent en outre l'avantage d'être incluses dans la liste des organismes G.R.A.S. ("Generally Recognized As Safe"). Des levures privilégiées sont préférentiellement 15 des souches industrielles du genre Kluyveromyces capables de répliquer de façon stable lesdits plasmides dérivés du plasmide pKD1 et dans lesquels a été inséré un marqueur de sélection ainsi qu'une cassette d'expression permettant la sécrétion à des niveaux élevés des polypeptides de l'invention.

La présente invention concerne également les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides chimères décrits ci-avant, ainsi que les cellules 20 recombinantes, eucaryotes ou procaryotes, comprenant de telles séquences.

La présente invention concerne aussi l'application à titre de médicament des polypeptides selon la présente invention. Plus particulièrement, l'invention a pour objet toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides ou 25 séquences nucléotidiques tels que décrits ci-avant. Les séquences nucléotidiques peuvent en effet être utilisées en thérapie génique.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LISTE DES FIGURES

Les représentations des plasmides indiquées dans les Figures suivantes ne sont pas tracées à l'échelle et seuls les sites de restriction importants pour la compréhension des clonages réalisés ont été indiqués.

5      **Figure 1 :** Schématisation des chimères du type SAH-PEPTIDE (A), du type PEPTIDE-SAH (B) ou PEPTIDE-SAH-PEPTIDE (C). Abréviations utilisées : M/LP, résidu méthionine initiateur de la traduction, éventuellement suivie d'une séquence signal de sécrétion; SAH, albumine mature ou un de ses variants moléculaires; PEP, peptide d'origine naturelle ou artificielle possédant une propriété thérapeutique donnée. La séquence PEP peut être présente plusieurs fois dans les 10 molécules de type A, B ou C. La flèche noire indique l'extrémité N-terminale de la protéine mature.

15      **Figure 2 :** Exemples de séquences nucléotidiques d'un fragment de restriction HindIII codant pour une protéine chimère du type prépro-SAH-PEPTIDE. Les flèches noires indiquent la fin des régions "pré" et "pro" de la SAH. Le site de restriction MstII est souligné et le codon spécifiant la terminaison de la traduction est en caractères gras.

20      **Figure 3 :** Carte de restriction du plasmide pYG105 et stratégie générique de construction des plasmides d'expression des protéines chimères de la présente invention. Abréviations utilisées : P, promoteur transcriptionnel ; T, terminateur transcriptionnel ; IR, séquences répétées inversées du plasmide pKD1 ; LP, séquence signal de sécrétion ;  $Ap^r$  et  $Km^r$  désignent respectivement les gènes de résistance à l'ampicilline (*E. coli*) et au G418 (levures).

25      **Figure 4 :** Exemples de séquences nucléotidiques de fragments de restriction MstII-HindIII dérivés du facteur von Willebrand. Représentation de la structure des fragments MstII-HindIII des plasmides pYG1248 (panneau A), pYG1214 (panneau B), pYG1206 [panneau C, dans cette chimère particulière le résidu Leu694 du vWF est également le dernier résidu (Leu585) de la SAH] et pYG1223 (panneau D) ; la numérotation des acides aminés correspond à la numérotation du vWF mature d'après Titani et al. [Biochemistry 25 (1986) 3171-3184]. Les sites de restriction MstII et HindIII sont soulignés et le codon de

terminaison de la traduction est en caractères gras. Panneau E : séquence nucléotidique du fragment de restriction MstII-HindIII du plasmide pYG1248. La numérotation des acides aminés (colonne de droite) correspond à la protéine chimère SAH-vWF470->713 mature (829 résidus). Les résidus Thr470, Leu494, Asp498, 5 Pro502, Tyr508, Leu694, Pro704, et Pro708 du vWF mature sont soulignés.

Figure 5 : Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1248 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-vWF Thr470->Val713) et pKan707 (plasmide contrôle). Dans cette expérience les résultats des panneaux A, B, 10 et C ont été migrés sur le même gel (SDS-PAGE 8,5 %) puis traités séparément.

A, coloration au bleu de coomassie; standard de poids moléculaire (piste 2); surnageant équivalent à 50 µl de la culture transformée par les plasmides pKan707 en milieu YPL (piste 1), ou pYG1248 en milieu YPD (piste 3) ou YPL (piste 4).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation 15 d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain: même légende qu'en A à l'exception que des standards biotinilés de poids moléculaire ont été utilisés.

C, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation 20 d'anticorps de lapin dirigés contre l'albumine humaine: surnageant équivalent à 50 µl de la culture transformée par les plasmides pKan707 en milieu YPL (piste 1), ou pYG1248 en milieu YPD (piste 2) ou YPL (piste 3).

Figure 6 : Cinétique de sécrétion d'une chimère de l'invention par la souche CBS 293.91 transformée par le plasmide pYG1206 (SAH-vWF Leu694-Pro708).

A, coloration au bleu de coomassie ; standard de poids moléculaire (piste 1) ; 25 surnageant équivalent à 2,5 µl d'une culture "Fed Batch" en milieu YPD après 24h. (piste 2), 40h. (piste 3) ou 46h. (piste 4) de croissance.

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps de souris dirigés contre le vWF humain : même légende qu'en A à l'exception que des standards biotinilés de poids moléculaire ont été utilisés.

30 Figure 7 : Caractérisation du matériel sécrété par K. lactis transformé par les plasmides pKan707 (plasmide contrôle, piste 2), pYG1206 (piste 3), pYG1214 (piste 4) et pYG1223 (piste 5) ; standard de poids moléculaire (piste 1). Les dépôts correspondent à 50 µl de surnageant d'une culture stationnaire après

croissance en milieu YPD, migration dans un gel à 8.5 % d'acrylamide et coloration au bleu de coomassie.

5 **Figure 8 :** Séquence nucléotidique du fragment de restriction MstII-HindIII du plasmide pYG1341 (SAH-UK1->135). La limite du domaine EGF-like (UK1->46) présent dans le fragment de restriction MstII-HindIII du plasmide pYG1340 est indiquée. La numérotation des acides aminés correspond à la protéine chimère SAH-UK1->135 mature (720 résidus).

10 **Figure 9 :** Sécrétion des chimères SAH-UK1-46 et SAH-UK1-135 par la souche CBS 293.91 respectivement transformée par les plasmides pYG1343 (SAH-UK1-46) et pYG1345 (SAH-UK1-135), après 4 jours de croissance (milieu YPL+G418). Les dépôts (équivalents à 50 µl de culture) sont migrés en gel PAGE-SDS à 8,5 % et colorés au bleu de coomassie: surnageant d'un clone transformé par les plasmides pKan707 (piste 1), pYG1343 (piste 3) ou pYG1345 (piste 4); standard de poids moléculaire (piste 2).

15 **Figure 10 :** Séquence nucléotidique du fragment de restriction MstII-HindIII du plasmide pYG1259 (SAH-G.CSF). La limite de la partie G-CSF (174 résidus) est indiquée. Les sites de restriction ApaI et SstI (SstI) sont soulignés. La numérotation des acides aminés correspond à la protéine chimère SAH-G.CSF mature (759 résidus).

20 **Figure 11 :** Séquence nucléotidique du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1301 (chimère G.CSF-Gly4-SAH). Les flèches noires indiquent la fin des régions "pré" et "pro" de la SAH. Les sites de restriction ApaI, SstI (SacI) et MstII sont soulignés. Les domaines G.CSF (174 résidus) et SAH (585 résidus) sont séparés par le linker synthétique GGGG. La numérotation des acides aminés correspond à la protéine chimère G.CSF-Gly4-SAH mature (763 résidus). La séquence nucléotidique comprise entre le codon de terminaison de la traduction et le site HindIII provient de l'ADN complémentaire (cDNA) de la SAH tel que décrit dans la demande de brevet EP 361 991.

30 **Figure 12 :** Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1266 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-G.CSF) et pKan707 (plasmide

contrôle). Dans cette expérience les résultats des panneaux A, B, et C ont été migrés sur le même gel (SDS-PAGE 8,5 %) puis traités séparément.

5 A, coloration au bleu de coomassie; standard de poids moléculaire (piste 2) ; surnageant équivalent à 100 µl de la culture transformée par les plasmides pKan707 en milieu YPL (piste 1), ou pYG1266 en milieu YPD (piste 3) ou YPL (piste 4).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps primaires dirigés contre le G-CSF humain : même légende qu'en A.

C, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps primaires dirigés contre l'albumine humaine : même légende qu'en A.

10 Figure 13 : Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers en milieu YPD) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1267 (chimère SAH-G.CSF), pYG1303 (chimère G.CSF-Gly4-SAH) et pYG1352 (chimère SAH-Gly4-G.CSF) après migration sur gel SDS-PAGE 8,5 %.

15 A, coloration au bleu de coomassie ; surnageant équivalent à 100 µl de la culture transformée par les plasmides pYG1303 (piste 1), pYG1267 (piste 2) ou pYG1352 (piste 3); standard de poids moléculaire (piste 4).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps primaires dirigés contre le G-CSF humain : même légende qu'en A.

20 Figure 14 : Séquence nucléotidique du fragment de restriction MstII-HindIII du plasmide pYG1382 (SAH-Fv'). Les domaines VH (124 résidus) et VL (107 résidus) du fragment Fv' sont séparés par le linker synthétique (GGGGS)<sub>x3</sub>. La numérotation des acides aminés correspond à la protéine chimère SAH-Fv' mature (831 résidus).

25 Figure 15 : Sécrétion de la chimère SAH-Fv' par la souche CBS 293.91 transformée par le plasmide pYG1383 (LAC4) après 4 jours de croissance en erlenmeyers à 28°C en milieu YPD (piste 2), ou YPL (piste 3) ; standard de poids moléculaire (piste 1). Les dépôts, équivalents à 200 µl de culture (précipitation à l'éthanol), sont migrés en gel PAGE-SDS (8,5 %).

A, : coloration du gel au bleu de coomassie.

30 B, : caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps primaires dirigés contre la SAH.

5 **Figure 16 :** Dosage de l'activité antagoniste *in vitro* de l'agglutination des plaquettes humaines fixées au formaldéhyde : CI50 des hybrides SAH-vWF694-708, [SAH-vWF470-713 C471G, C474G] et [SAH-vWF470-704 C471G, C474G] relativement à l'étalement RG12986. La détermination de l'inhibition dose-dépendante de l'agglutination plaquettaire est réalisée selon la méthode décrite par C. Prior et al. [Bio/Technology (1992) 10 66] en utilisant un agrégamètre enregistrant les variations de la transmission optique sous agitation à 37°C en présence de vWF humain, de botrocétine (8,2 mg/ml) et du produit à tester à différentes dilutions. La concentration du produit qui permet d'inhiber de moitié l'agglutination contrôle (en l'absence de produit) est alors déterminée (CI50).

10

15 **Figure 17 :** Activité sur la prolifération cellulaire *in vitro* de la lignée murine NFS60. La radioactivité ( $^3\text{H}$ -thymidine) incorporée dans les noyaux cellulaires après 6 heures d'incubation est représentée en ordonnée (cpm) ; la quantité de produit indiquée en abscisse est exprimée en molarité (unités arbitraires).

20 **Figure 18 :** Activité sur la granulopoïèse *in vivo* chez le rat. Le nombre de neutrophiles (moyenne de 7 animaux) est indiquée en ordonnée en fonction du temps. Les produits testés sont la chimère SAH-G.CSF (pYG1266, 4 ou 40 mg/rat/jour), le G-CSF référence (10 mg/rat/jour), la SAH recombinante purifiée à partir de surnageant de Kluyveromyces lactis (SAH, 30 mg/rat/jour, cf. EP 361 991), ou du sérum physiologique.

### EXEMPLES

### TECHNIQUES GENERALES DE CLONAGE

25 Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césum, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans Escherichia coli etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la

30 littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982 ; Ausubel F.M. et al.

(eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham et sont utilisées 5 selon les recommandations des fournisseurs.

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par 10 électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence 15 de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 20 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les 25 spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Les transformations de K. lactis avec l'ADN des plasmides d'expression des 30 protéines de la présente invention sont effectuées par toute technique connue de l'homme de l'art, et dont un exemple est donné dans le texte.

Sauf indication contraire, les souches bactériennes utilisées sont E. coli MC1060 (lacIPOZYA, X74, galU, galK, strA<sup>r</sup>), ou E. coli TG1 (lac, proA,B, supE, thi, hsdD5 / F'traD36, proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>, lacZ, M15).

Les souches de levures utilisées appartiennent aux levures bourgeonnantes et plus particulièrement aux levures du genre Kluyveromyces. Les souche K. lactis MW98-8C (a, uraA, arg, lys, K<sup>+</sup>, pKD1<sup>o</sup>) et K. lactis CBS 293.91 ont été particulièrement utilisées; un échantillon de la souche MW98-8C a été déposé le 16 5 Septembre 1988 au Centraalbureau voor Schimmelkulturen (CBS) à Baarn (Pays Bas) où il a été enregistré sous le numéro CBS 579.88.

Une souche bactérienne (E. coli) transformée avec le plasmide pET-8c52K a été déposée le 17 Avril 1990 auprès de l'American Type Culture Collection sous le numéro ATCC 68306.

10 Les souches de levures transformées par les plasmides d'expression codant pour les protéines de la présente invention sont cultivées en erlenmeyers ou en fermenteurs pilotes de 2l (SETRIC, France) à 28°C en milieu riche (YPD: 1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% glucose; ou YPL: 1% yeast extract, 2% Bactopeptone, 2% lactose) sous agitation constante.

15 **EXAMPLE 1 : COUPLAGE EN C-TERMINAL DE LA SAH**

Le plasmide pYG404 est décrit dans la demande de brevet EP 361 991. Ce plasmide comporte un fragment de restriction HindIII codant pour le gène de la prépro-SAH précédé des 21 nucléotides naturellement présents immédiatement en amont de l'ATG initiateur de traduction du gène PGK de S. cerevisiae. La séquence nucléotidique de ce fragment de restriction est incluse dans celle de la Figure 2. Le site MstII localisé dans la séquence codante, à trois résidus du codon spécifiant la fin de traduction est particulièrement utile comme site de clonage d'un peptide biologiquement actif que l'on désire coupler en phase traductionnelle en C-terminal de la SAH. Dans un mode de réalisation particulier, il est utile d'utiliser des peptides dont la séquence est codée par un fragment de restriction MstII-HindIII du type : 5'-CCTTAGGCTTA [3xN]p TAAGCTT-3', la séquence codant le peptide (p résidus) biologiquement actif est [3xN]p). La ligature de ce fragment avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (résidus leucine-glycine-leucine) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Dans un 20 25 30

autre mode de réalisation, le peptide biologiquement actif peut être présent plus d'une fois dans la chimère.

#### EXEMPLE 2 : COUPLAGE EN N-TERMINAL DE LA SAH

Dans un mode réalisation particulier, les techniques combinées de 5 mutagénèse dirigée et d'amplification PCR permettent de construire des gènes hybrides codant pour une protéine chimère résultant du couplage traductionnel entre un peptide signal (et par exemple la région prépro de la SAH), une séquence incluant le peptide biologiquement actif et la forme mature de la SAH ou un de ses variants moléculaires. Ces gènes hybrides sont préférentiellement bordés en 5' de l'ATG 10 initiateur de traduction et en 3' du codon de fin de traduction par des sites de restriction HindIII et codent pour des protéines chimères du type PEPTIDE-SAH (Figure 1, panneau B). Dans un mode réalisation encore plus particulier, le peptide biologiquement actif peut être présent plus d'une fois dans la chimère.

#### EXEMPLE 3 : COUPLAGE EN N- ET C-TERMINAL DE LA SAH

15 Les techniques combinées de mutagénèse dirigée et d'amplification PCR décrisées dans les exemples 1 et 2 permettent de construire des gènes hybrides codant pour une protéine chimère résultant du couplage traductionnel entre la forme mature de la SAH, ou un de ses variants moléculaires, et un peptide biologiquement actif 20 couplé aux extrémités N- et C-terminales de la SAH. Ces gènes hybrides sont préférentiellement bordés en 5' de l'ATG initiateur de traduction et en 3' du codon de fin de traduction par des sites de restriction HindIII et codent pour des protéines chimères du type PEPTIDE-SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau C), immédiatement 25 précédées de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Dans un mode réalisation encore plus particulier, le peptide biologiquement actif peut être présent plus d'une fois dans la chimère.

#### EXEMPLE 4 : PLASMIDES D'EXPRESSION

Les protéines chimères des exemples précédents peuvent être exprimées dans les levures à partir de promoteurs fonctionnels, régulables ou constitutifs, tels que, par exemple, ceux présents dans les plasmides pYG105 (promoteur LAC4 de Kluyveromyces lactis), pYG106 (promoteur PGK de Saccharomyces cerevisiae), 5 pYG536 (promoteur PHO5 de S.cerevisiae), ou des promoteur hybrides tels que ceux décrits dans la demande de brevet EP 361 991. Les plasmides pYG105 et pYG106 sont ici particulièrement utiles car ils permettent l'expression des gènes codés par les fragments de restriction HindIII tel que décrits dans les exemples 10 précédents et clonés dans le site HindIII et dans l'orientation productive (définie comme l'orientation qui place la région "prépro" de l'albumine de façon proximale par rapport au promoteur de transcription), à partir de promoteurs fonctionnels chez K.lactis, régulables (pYG105) ou constitutifs (pYG106). Le plasmide pYG105 correspond au plasmide pKan707 décrit dans la demande de brevet EP 361 991 dans 15 lequel le site de restriction HindIII unique et localisé dans le gène de résistance à la génétidine (G418) a été détruit par mutagénèse dirigée tout en conservant une protéine inchangée (oligodeoxynucléotide 5'-GAAATGCATAAGCTCTGCCATT-CTCACCG-3'). Le fragment SalI-SacI codant pour le gène URA3 du plasmide muté a été ensuite remplacé par un fragment de restriction SalI-SacI comportant une 20 cassette d'expression constituée du promoteur LAC4 de K. lactis (sous la forme d'un fragment SalI-HindIII) et du terminateur du gène PGK de S. cerevisiae (sous la forme d'un fragment HindIII-SacI). Le plasmide pYG105 est mitotiquement très stable chez les levures Kluyveromyces et une carte de restriction en est donnée à la 25 Figure 3. Les plasmides pYG105 et pYG106 ne diffèrent entre eux que par la nature du promoteur de transcription encodé par le fragment SalI-HindIII.

#### EXEMPLE 5 : TRANSFORMATION DES LEVURES

La transformation des levures appartenant au genre Kluyveromyces, et en particulier les souches MW98-8C et CBS 293.91 de K. lactis, s'effectue par exemple par la technique de traitement des cellules entières par de l'acétate de lithium [Ito H. et al., J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168], adaptée comme suit. La croissance des cellules se fait à 28°C dans 50 ml de milieu YPD, avec agitation et jusqu'à une densité optique à 600 nm (DO<sub>600</sub>) comprise entre 0,6 et 0,8; les cellules sont 30

récoltées par centrifugation à faible vitesse, lavées dans une solution stérile de TE (10 mM Tris HCl pH 7,4; 1 mM EDTA), resuspendues dans 3-4 ml d'acétate-lithium (0,1 M dans du TE) pour obtenir une densité cellulaire d'environ  $2 \times 10^8$  cellules/ml, puis incubées à 30°C pendant 1 heure sous agitation modérée. Des aliquotes de 0,1 ml de la suspension résultante de cellules compétentes sont incubés à 30°C pendant 1 heure en présence d'ADN et à une concentration finale de 35% de polyéthylène glycol (PEG4000, Sigma). Après un choc thermique de 5 minutes à 42°C, les cellules sont lavées 2 fois, resuspendues dans 0,2 ml d'eau stérile et incubées 16 heures à 28°C dans 2 ml de milieu YPD pour permettre l'expression phénotypique du gène de résistance au G418 exprimé sous contrôle du promoteur Pk1 (cf. EP 361 991); 200 µl de la suspension cellulaire sont ensuite étalés sur boites YPD sélectives (G418, 200 µg/ml). Les boites sont mises à incuber à 28°C et les transformants apparaissent après 2 à 3 jours de croissance cellulaire.

#### EXEMPLE 6 : SECRETION DES CHIMERES

Après sélection sur milieu riche supplémenté en G418 les clones recombinants sont testés pour leur capacité à sécréter la forme mature des protéines chimères. Quelques clones correspondant à la souche CBS 293.91 ou MW98-8C transformée par les plasmides d'expression des chimères entre la SAH et la partie biologiquement active sont mis à incuber en milieu YPD ou YPL à 28°C. Les surnageants cellulaires sont récupérés par centrifugation quand les cellules atteignent la phase stationnaire de croissance, éventuellement concentrés 10 fois par précipitation pendant 30 minutes à -20°C dans une concentration finale de 60% d'éthanol, puis testés après électrophorèse en gel SDS-PAGE à 8.5%, soit directement par coloration du gel par du bleu de coomassie, soit après immunoblot en utilisant des anticorps primaires dirigés contre la partie biologiquement active ou un sérum polyclonal de lapin dirigé contre la SAH. Lors des expériences de détection immunologique, le filtre de nitrocellulose est d'abord incubé en présence des anticorps primaires spécifiques, lavé plusieurs fois, incubé en présence d'anticorps de chèvre dirigés contre les anticorps primaires, puis incubé en présence d'un complexe avidine-péroxidase en utilisant le "kit ABC" distribué par Vectastain (Biosys S.A., Compiègne, France). La réaction immunologique est ensuite révélée par addition de diamino-3,3' benzidine tetrachlorhydrate (Prolabo) en présence d'eau oxygénée, selon les recommandations du fabricant.

## EXEMPLE 7 : CHIMERES DERIVEES DU FACTEUR VON WILLEBRAND

## E.7.1. Fragments antagonistes de la fixation du vWF aux plaquettes.

## E.7.1.1. Résidus Thr470-Val713 du vWF.

Le plasmide pET-8c52K comporte un fragment du cDNA du vWF codant pour les résidus 445 à 733 du vWF humain et inclus donc plusieurs déterminants cruciaux de l'interaction entre le vWF et les plaquettes d'une part, et certains éléments de la membrane basale et du tissu sous-endothelial d'autre part, et notamment les peptides G10 et D5 antagonistes de l'interaction entre vWF et GP1b [Mori H. et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904]. Cette séquence peptidique est identique à la séquence correspondante décrite par Titani et al. [Biochemistry 25 (1986) 3171-3184]. L'amplification de ces déterminants génétiques peut être réalisée à partir du plasmide pET-8c52K, par exemple par la technique d'amplification PCR, en utilisant comme amorce des oligodéoxynucléotides codant pour des résidus contigus localisés de part et d'autres de la séquence à amplifier. Les fragments amplifiés sont ensuite clonés dans des vecteurs du type M13 en vue de leur vérification par séquençage en utilisant soit les amores universelles situées de part et d'autre du multisite de clonage, soit des oligodéoxynucléotides spécifiques de la région amplifiée du gène du vWF dont la séquence de plusieurs isomorphes est connue [Sadler J.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985) 6394-6398; Verweij C.L. et al., EMBO J. 5 (1986) 1839-1847; Shelton-Inloes B.B. et al., Biochemistry 25 (1986) 3164-3171; Bonthon D. et al., Nucleic Acids Res. 17 (1986) 7125-7127]. Ainsi, l'amplification PCR du plasmide pET-8c52K avec les oligodéoxynucléotides 5'-CCCGGGATCCCTTAGGCTAACCTGTGAAGCCTGC-3' (Sq1969, le site MstII est souligné) et 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAGACTTGCCATGTCG-3' (Sq2029, le site HindIII est souligné) génère un fragment de restriction MstII-HindIII incluant les résidus Thr470 à Val713 du vWF (Figure 4, panneau E). La ligature de ce fragment avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Ce fragment de restriction est cloné dans l'orientation productive et dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1248 (SAH-vWF470-713).

## E.7.1.2. Variants moléculaires:

Dans un autre mode de réalisation, le site de liaison du vWF est un peptide incluant les résidus Thr470 à Asp498 du vWF mature. Cette séquence inclus le peptide G10 (Cys474-Pro488) décrit par Mori et al. [J. Biol. Chem. 263 (1988) 17901-17904] et capable d'antagoniser l'interaction du vWF humain à la GP1b des plaquettes humaines. La séquence correspondant au peptide G10 est d'abord incluse dans un fragment de restriction MstII-HindIII (Figure 4, panneau B), par exemple par amplification PCR du plasmide pET-8c52K avec les oligodéoxynucléotides Sq1969 et 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAGTCCTCCACATACAG-3' (Sq1970, le site HindIII est souligné), ce qui génère un fragment de restriction MstII-HindIII incluant le peptide G10, et dont la séquence est: 5'-CCTTAGGCTTAACCTGTGA-AGCCTGCCAGGAGCCGGAGGCCTGGTGGTGCCTCCCACAGATGCC-CCGGTGAGCCCCACCACTCTGTATGTGGAGGACTAAGCTT-3' (la séquence codant pour le peptide G10 est en caractères gras). La ligature de ce fragment avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Ce fragment de restriction est cloné dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1214.

Dans un autre mode de réalisation, le site de liaison du vWF à la GP1b est directement conçu à l'aide d'oligodéoxynucléotides synthétiques, et par exemple les oligodéoxynucléotides 5'-TTAGGCCTCTGTGACCTTGCCCCTG-25 AAGCCCCCTCCTCCTACTCTGCCCCCCTAAGCTTA-3' et 5'-GATC-TAAGCTTAGGGGGCAGAGTAGGAGGAGGGCTTCAGGGCAAGGTC-ACAGAGGCC-3'. Ces oligodéoxynucléotides forment en s'appariant un fragment de restriction MstII-BglII incluant le fragment MstII-HindIII (Figure 4, panneau C) correspondant au peptide D5 défini par les résidus Leu694 à Pro708 du vWF. La ligature du fragment MstII-HindIII avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation

"prépro" de la SAH. Ce fragment de restriction est cloné dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1206.

Des variants utiles du plasmide pET-8c52K sont délétrés par mutagénèse dirigée entre les peptides G10 et D5, par exemple des sites de fixation au collagène, et/ou à l'héparine, et/ou à la botrocétine, et/ou aux sulfatides et/ou à la ristocétine. Un exemple est le plasmide pMMB9 délétré par mutagénèse dirigée entre les résidus Cys509 et Ile662. L'amplification PCR de ce plasmide avec les oligodéoxynucléotides Sq1969 et Sq2029 génère un fragment de restriction MstII-HindIII (Figure 4, panneau D) incluant les résidus Thr470 à Tyr508 et Arg663 à Val713 et en particulier les peptides G10 et D5 du vWF et délétré en particulier de son site de fixation au collagène localisé entre les résidus Glu542 et Met622 [Roth G.J. et al. *Biochemistry* 25 (1986) 8357-8361]. La ligature de ce fragment avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Ce fragment de restriction est cloné dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1223.

Dans d'autres modes de réalisation, l'utilisation des techniques combinées de mutagénèse dirigée et d'amplification PCR permet de générer à volonté des variants du fragment de restriction MstII-HindIII du panneau A de la Figure 4 mais délétrés d'un ou plusieurs sites de fixation aux sulfatides et/ou à la botrocétine et/ou à l'héparine et/ou au collagène, et/ou substitué par tout résidu impliqué dans l'émergence de pathologies de type IIB associée au vWF.

Dans d'autres variants utiles du plasmide pET-8c52K des mutations sont introduites, par exemple par mutagénèse dirigée, pour remplacer ou supprimer tout ou partie de l'ensemble des cystéines présentes aux positions 471, 474, 509 et 695 du vWF humain. Des exemples particuliers sont les plasmides p5E et p7E dans lesquels les cystéines présentes aux positions 471 et 474 d'une part et aux positions 471, 474, 509 et 695 d'autre part ont été respectivement remplacés par des résidus glycine. L'amplification PCR de ces plasmides avec les oligodéoxynucléotides Sq2149 (5'-CCGGGGATCCCTTAGGCTTAACCGGTGAAGCCGGC-3'), le site MstII est

souligné) et Sq2029 permet de générer des fragments de restriction MstII-HindIII incluant les résidus Thr470 à Val713 du vWF naturel à l'exception qu'au moins les résidus cystéine aux positions 471 et 474 ont été mutés en des résidus glycine. La ligature de ces fragments avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) génère un fragment de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Ces fragments de restriction sont clonés dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère les plasmides d'expression pYG1283 (chimère SAH-vWF470-713, C471G, C474G) et pYG1279 (chimère SAH-vWF470-713, C471G, C474G, C509G, C695G).

D'autres mutations particulièrement utiles concernent au moins un résidu impliqué dans des pathologies de type IIB associées au vWF (augmentation de l'affinité intrinsèque du vWF pour la GP1b), comme les résidus Arg543, Arg545, Trp550, Val551, Val553, Pro574 ou Arg578 par exemple. Les techniques de recombinaison génétique in vitro permettent également d'introduire à volonté un ou des résidus supplémentaires dans la séquence du vWF et par exemple une méthionine surnuméraire entre les positions Asp539 et Glu542.

## 20 E.7.2. Fragments antagonistes de la fixation du vWF au sous- endothélium.

Dans un mode de réalisation particulier, les sites de liaison du vWF aux composants du tissu sous-endothélial, et par exemple du collagène, sont générés par amplification PCR du plasmide pET-8c52K, par exemple avec les oligodéoxynucléotides Sq2258 (5'-GGATCCTTAGGCTG-25 25-3') et Sq2259 (5'-TGCAGCAGGCTACTGGACCTGGTC-3', le site MstII est souligné) et Sq2259 (5'-GAATTCAAGCTTACAGAGGTAGCTAACGATCTCGTCCC-3', le site HindIII est souligné), ce qui génère un fragment de restriction MstII-HindIII codant pour les résidus Cys509 à Cys695 du vWF naturel. Des variants moléculaires de délétion ou 30 modifiés sont également générés qui comportent toute combinaison souhaitable entre les sites de fixation du vWF aux sulfatides et/ou à la botrocétine et/ou à l'héparine et/ou au collagène et/ou tout résidu responsable d'une modification de l'affinité du vWF pour la GP1b (pathologies de type II associée au vWF). Dans un autre mode de réalisation, le domaine capable de se fixer au collagène peut également provenir du

fragment du vWF compris entre les résidus 911 et 1114 et décrit par Parietti et al. [J. Biol. Chem. (1987) 262: 13835-13841]. La ligature de ces fragments avec le fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (cf. Figure 2) 5 génère des fragments de restriction HindIII comportant un gène hybride codant pour une protéine chimère du type SAH-PEPTIDE (Figure 1, panneau A), immédiatement précédée de la région d'exportation "prépro" de la SAH. Ces fragments de restriction sont clonés dans l'orientation productive dans le site HindIII du plasmide pYG105, ce qui génère les plasmides d'expression correspondants, et par exemple le plasmide 10 pYG1277 (SAH-vWF509-695).

#### **E.7.3. Purification et caractérisation moléculaire des chimères entre SAH et vWF.**

Les chimères présentes dans les surnageants de culture correspondant à la souche CBS 293.91 transformée, par exemple par les plasmides d'expression selon 15 les exemples E.7.1. et E.7.2., sont caractérisées dans un premier temps à l'aide d'anticorps spécifiques de la partie SAH et de la partie vWF. Les résultats des Figures 5 à 7 démontrent que la levure K. lactis est capable de sécréter des protéines chimères entre la SAH et un fragment du vWF, et que ces chimères sont immunologiquement réactives. Il peut être également souhaitable de purifier 20 certaines de ces chimères. La culture est alors centrifugée (10000 g, 30 min), le surnageant est passé à travers un filtre de 0,22 mm (Millipore), puis concentré par ultrafiltration (Amicon) en utilisant une membrane dont le seuil de discrimination se situe à 30 kDa. Le concentrat obtenu est alors dialysé contre une solution de Tris HCl (50 mM pH 8) puis purifié sur colonne. Par exemple, le concentrat 25 correspondant au surnageant de culture de la souche CBS 293.91 transformée par le plasmide pYG1206 est purifiée par chromatographie d'affinité sur Bleu-Trisacryl (IBF). Une purification par chromatographie d'échange d'ions peut également être utilisée. Par exemple dans le cas de la chimère SAH-vWF470-713, le concentrat obtenu après ultrafiltration est dialysé contre une solution de Tris HCl (50 mM pH 30 8), puis déposé par fractions de 20 ml sur une colonne (5 ml) échangeuse de cations (S Fast Flow, Pharmacia) équilibrée dans le même tampon. La colonne est alors lavée plusieurs fois par la solution de Tris HCl (50 mM pH 8) et la protéine chimère est alors éluée de la colonne par un gradient (0 à 1 M) de NaCl. Les fractions contenant la protéine chimère sont alors réunies et dialysées contre une solution de

Tris HCl 50 mM (pH 8) puis redéposées sur colonne S Fast Flow. Après élution de la colonne, les fractions contenant la protéine sont réunies, dialysées contre de l'eau et lyophilisées avant caractérisation: par exemple, le séquençage (Applied Biosystem) de la protéine [SAH-vWF470-704 C471G, C474G] sécrétée par la levure CBS 293.91 donne la séquence N-terminale attendue de la SAH (Asp-Ala-His...), démontrant une maturation correcte de la chimère immédiatement en C-terminal du doublet de résidus Arg-Arg de la région "pro" de la SAH (Figure 2). Le caractère essentiellement monomérique des protéines chimères entre SAH et vWF est également confirmé par leur profil d'élution sur colonne TSK 3000 [Toyo Soda Company, équilibrée par une solution de cacodylate (pH 7) contenant 0,2 M de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]: par exemple la chimère [SAH-vWF 470-704 C471G, C474G] se comporte dans ces conditions comme une protéine de poids moléculaire apparent de 95 kDa démontrant son caractère monomérique.

#### EXEMPLE 8 : CHIMERES DERIVEES DE L'UROKINASE

##### 15 E.8.1. Constructions.

Un fragment correspondant au fragment amino-terminal de l'urokinase (ATF: domaine EGF-like + domaine kringle) peut être obtenu à partir de l'ARN messager correspondant des cellules de certains carcinome humain, par exemple en utilisant le kit RT-PCR distribué par Pharmacia. Un fragment de restriction MstII-HindIII incluant l'ATF de l'urokinase humaine est donné à la Figure 8. La ligature du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 avec ce fragment MstII-HindIII permet de générer le fragment HindIII du plasmide pYG1341 qui code pour une protéine chimère dans laquelle la molécule de SAH est génétiquement couplée à l'ATF (SAH-UK1->135). De façon similaire, le plasmide pYG1340 contient un fragment HindIII codant pour une chimère composée de la SAH immédiatement suivi par les 46 premiers résidus de l'urokinase humaine (SAH-UK1->46, cf. Figure 8). Le clonage dans l'orientation productive du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1340 (SAH-UK1->46) dans le site HindIII des plasmides pYG105 (LAC4) et pYG106 (PGK) génère les plasmides d'expression pYG1343 et pYG1342, respectivement. De façon similaire, le clonage dans l'orientation productive du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1341 (SAH-UK1->135) dans le site HindIII des plasmides pYG105 (LAC4) et pYG106 (PGK) génère les plasmides d'expression pYG1345 et pYG1344, respectivement.

**E.8.2. Sécrétion des hybrides.**

Après sélection sur milieu riche supplémenté en G418 les clones recombinants sont testés pour leur capacité à sécréter la forme mature des protéines chimères SAH-UK. Quelques clones correspondant à la souche K. lactis CBS 293.91 transformée par les plasmides d'expression selon l'exemple E.9.1. sont mis à incuber en milieu liquide complet sélectif à 28°C. Les surnageants cellulaires sont alors testés après électrophorèse en gel d'acrylamide à 8.5 %, soit directement par coloration du gel au bleu de coomassie, soit après immunoblot en utilisant comme anticorps primaires un sérum polyclonal de lapin dirigé contre l'albumine humaine ou contre l'urokinase humaine. Les résultats de la Figure 9 démontrent que les protéines hybrides SAH-UK1->46 et SAH-UK1->135 sont particulièrement bien sécrétées par la levure Kluyveromyces.

**E.8.3. Purification des chimères entre SAH et urokinase.**

Après centrifugation d'une culture de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides d'expression selon l'exemple E.8.1., le surnageant de culture est passé à travers un filtre de 0,22 mm (Millipore), puis concentré par ultrafiltration (Amicon) en utilisant une membrane dont le seuil de discrimination se situe à 30 kDa. Le concentrat obtenu est alors ajusté à 50 mM Tris HCl à partir d'une solution stock de Tris HCl 1M (pH 7), puis déposé par fractions de 20 ml sur une colonne (3 ml) échangeuse d'anions (D-Zephyr, Sepracor) équilibrée dans le même tampon. La protéine chimère (SAH-UK1->46 ou SAH-UK1->135) est alors éluée de la colonne par un gradient (0 à 1 M) de NaCl. Les fractions contenant la protéine chimère sont alors réunies et dialysées contre une solution de Tris HCl 50 mM (pH 6) et redéposées sur colonne D-Zephyr équilibrée dans le même tampon. Après élution de la colonne, les fractions contenant la protéine sont réunies, dialysées contre de l'eau et lyophilisées avant caractérisation de leur activité biologique et notamment vis à vis de leur aptitude à déplacer l'urokinase de son récepteur cellulaire.

**EXAMPLE 9 : CHIMERES DERIVEES DU G-CSF****E.9.1. Constructions.****E.9.1.1. Couplage en C-terminal de la SAH.**

Un fragment de restriction MstII-HindIII incluant la forme mature du G-CSF humain est généré, par exemple selon la stratégie suivante : un fragment de

restriction KpnI-HindIII est d'abord obtenu par la technique d'amplification enzymatique PCR en utilisant les oligodéoxynucléotides Sq2291 (5'-CAAGGATCCAAAGCTTCAGGGCTGCGCAAGGTGGCGTAG-3', le site HindIII est souligné) et Sq2292 (5'-CGGGGTACCTTAGGCTTAACCCCCCTG-5' GGCCCTGCCAGC-3', le site KpnI est souligné) comme amorce sur le plasmide BBG13 servant comme matrice. Le plasmide BBG13 comporte le gène codant pour la forme B (174 acides aminés) du G-CSF mature humain, obtenu auprès de British Bio-technology Limited, Oxford, England. Le produit d'amplification enzymatique d'environ 550 nucléotides est ensuite digéré par les enzymes de restriction KpnI et HindIII et cloné dans le vecteur pUC19 coupé par les mêmes enzymes, ce qui génère le plasmide recombinant pYG1255. Ce plasmide est la source d'un fragment de restriction MstII-HindIII permettant de fusionner le G-CSF immédiatement en aval de la SAH (chimère SAH-G.CSF) et dont la séquence nucléotidique est donnée à la Figure 10.

Il peut être également souhaitable d'insérer un linker peptidique entre la partie SAH et G-CSF, par exemple pour permettre une meilleure présentation fonctionnelle de la partie transductrice. Un fragment de restriction MstII-HindIII est par exemple généré par substitution du fragment MstII-ApaI du plasmide pYG1255 par les oligodéoxynucléotides Sq2742 (5'-TTAGGCTAGGTGGTGGCGGTACCCCCC-20 TGGGCC-3', les codons codant pour les résidus glycine de ce linker particulier sont soulignés) et Sq2741 (5'-CAGGGGGTACCGCCACCACCTAAGCC-3') qui forment en s'appariant un fragment MstII-ApaI. Le plasmide ainsi généré comporte donc un fragment de restriction MstII-HindIII, dont la séquence est identique à celle de la Figure 10 à l'exception du fragment MstII-ApaI.

La ligature du fragment HindIII-MstII du plasmide pYG404 avec le fragment MstII-HindIII du plasmide pYG1255 permet de générer le fragment HindIII du plasmide pYG1259 qui code pour une protéine chimère dans laquelle la forme B du G-CSF mature est positionnée par couplage génétique en phase traductionnelle en C-terminal de la molécule de SAH (SAH-G.CSF).

Un fragment de restriction HindIII identique à l'exception du fragment MstII-ApaI peut également être facilement généré et qui code pour une protéine chimère dans laquelle la forme B du G-CSF mature est positionnée par couplage génétique en phase traductionnelle en C-terminal de la molécule de SAH et d'un linker peptidique

particulier. Par exemple ce linker est constitué de 4 résidus glycine dans le fragment HindIII du plasmide pYG1336 (chimère SAH-Gly4-G.CSF).

Le fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1259 est cloné dans l'orientation productive et dans le site de restriction HindIII du plasmide d'expression 5 pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1266 (SAH-G.CSF). Dans une autre exemplification, le clonage du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1259 dans l'orientation productive et dans le site HindIII du plasmide pYG106 génère le plasmide pYG1267. Les plasmides pYG1266 et pYG1267 sont isogéniques entre eux à l'exception du fragment de restriction Sall-HindIII codant pour le 10 promoteur LAC4 de K. lactis (plasmide pYG1266) ou le promoteur PGK de S. cerevisiae (plasmide pYG1267).

Dans une autre exemplification, le clonage dans l'orientation productive du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1336 (chimère SAH-Gly4-G.CSF) dans le site HindIII des plasmides pYG105 (LAC4) et pYG106 (PGK) génère les 15 plasmides d'expression pYG1351 et pYG1352, respectivement.

#### E.9.1.2. Couplage en N-terminal de la SAH.

Dans un mode réalisation particulier, les techniques combinées de mutagénèse dirigée et d'amplification PCR permettent de construire des gènes hybrides codant pour une protéine chimère résultant du couplage traductionnel entre 20 un peptide signal (et par exemple la région prépro de la SAH), une séquence incluant un gène ayant une activité G-CSF, et la forme mature de la SAH ou un de ses variants moléculaires (cf. chimère du panneau B, Figure 1). Ces gènes hybrides sont préférentiellement bordés en 5' de l'ATG initiateur de traduction et en 3' du codon de fin de traduction par des sites de restriction HindIII. Par exemple l'oligodéoxy- 25 nucléotide Sq2369 (5'-GTTCTACGCCACCTTGCGCGAGCCCGGTGGAGGCGGT-GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGG-3', les résidus soulignés (optionnels) correspondent dans cette chimère particulière à un linker peptidique composé de 4 résidus glycine) permet par mutagénèse dirigée de mettre en phase traductionnelle la forme mature du G-CSF humain du plasmide BBG13 30 immédiatement en amont de la forme mature de la SAH, ce qui génère le plasmide intermédiaire A. De façon similaire, l'utilisation de l'oligodéoxynucléotide Sq2338 [5'-CAGGGAGCTGGCAGGGCCCAGGGGGTTCGACGAAACACACCCCTG-GAATAAGCCGAGCT-3' (brin non codant), les nucléotides complémentaires aux nucléotides codant pour les premiers résidus N-terminaux de la forme mature du G-

CSF humain sont soulignés] permet par mutagénèse dirigée de coupler en phase traductionnelle de lecture la région prépro de la SAH immédiatement en amont de la forme mature du G-CSF humain, ce qui génère le plasmide intermédiaire B. On génère ensuite un fragment HindIII codant pour une protéine chimère du type 5 PEPTIDE-SAH (cf. Figure 1, panneau B) en associant le fragment HindIII-SstI du plasmide B (jonction région prépro de la SAH + fragment N-terminal du G-CSF mature) avec le fragment SstI-HindIII du plasmide A [jonction G-CSF mature-(glycine)<sub>4</sub>-SAH mature]. Le plasmide pYG1301 contient ce fragment de restriction HindIII particulier codant pour la chimère G.CSF-Gly4-SAH fusionnée 10 immédiatement en aval de la région prépro de la SAH (Figure 11). Le clonage de ce fragment de restriction HindIII dans l'orientation productive et dans le site HindIII des plasmides pYG105 (LAC4) et pYG106 (PGK) génère les plasmides d'expression pYG1302 et pYG1303, respectivement.

#### E.9.2. Sécrétion des hybrides.

15 Après sélection sur milieu riche supplémenté en G418 les clones recombinants sont testés pour leur capacité à sécréter la forme mature des protéines chimères entre SAH et G-CSF. Quelques clones correspondant à la souche K. lactis CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1266 ou pYG1267 (SAH-G.CSF), pYG1302 ou pYG1303 (G.CSF-Gly4-SAH) ou encore pYG1351 ou pYG1352 (SAH-Gly4-G.CSF) sont mis à incuber en milieu liquide complet sélectif à 28°C. 20 Les surnageants cellulaires sont alors testés après électrophorèse en gel d'acrylamide à 8.5 %, soit directement par coloration du gel au bleu de coomassie, soit après immunoblot en utilisant comme anticorps primaires des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre le G-CSF humain ou un sérum polyclonal de lapin dirigé contre 25 l'albumine humaine. Les résultats de la Figure 12 démontrent que la protéine hybride SAH-G.CSF est reconnue à la fois par des anticorps dirigés contre l'albumine humaine (panneau C) et le G-CSF humain (panneau B). Les résultats de la Figure 13 indiquent que la chimère SAH-Gly4-G.CSF (piste 3) est particulièrement bien sécrétée par la levure Kluyveromyces, probablement du fait que la présence du linker 30 peptidique entre partie SAH et partie G-CSF est plus favorable à un repliement indépendant de ces 2 parties lors du transit de la chimère dans la voie sécrétoire. De plus la fusion N-terminale (G.CSF-Gly4-SAH) est également sécrétée par la levure Kluyveromyces (Figure 13, piste 1).

### E.9.3. Purification et caractérisation moléculaire des chimères entre SAH et G-CSF.

Après centrifugation d'une culture de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides d'expression selon l'exemple E.9.1., le surnageant de culture est passé à travers un filtre de 0,22 mm (Millipore), puis concentré par ultrafiltration (Amicon) en utilisant une membrane dont le seuil de discrimination se situe à 30 kDa. Le concentrat obtenu est alors ajusté à 50 mM Tris HCl à partir d'une solution stock de Tris HCl 1M (pH 6), puis déposé par fractions de 20 ml sur une colonne (5 ml) échangeuse d'ions (Q Fast Flow, Pharmacia) équilibrée dans le même tampon. La protéine chimère est alors éluée de la colonne par un gradient (0 à 1 M) de NaCl. Les fractions contenant la protéine chimère sont alors réunies et dialysées contre une solution de Tris HCl 50 mM (pH 6) et redéposées sur colonne Q Fast Flow (1 ml) équilibrée dans le même tampon. Après élution de la colonne, les fractions contenant la protéine sont réunies, dialysées contre de l'eau et lyophilisées avant caractérisation: par exemple, le séquençage (Applied Biosystem) de la protéine SAH-G.CSF sécrétée par la levure CBS 293.91 donne la séquence N-terminale attendue de la SAH (Asp-Ala-His...), démontrant une maturation correcte de la chimère immédiatement en C-terminal du doublet de résidus Arg-Arg de la région "pro" de la SAH (Figure 2).

## 20 EXEMPLE 10 : CHIMERES DERIVEES D'UNE IMMUNOGLOBULINE

### E.10.1. Constructions.

Un fragment Fv' peut être construit par les techniques du génie génétique, et qui code pour les fragments variables des chaînes lourdes et légères d'une immunoglobuline (Ig), reliés entre eux par un peptide linker [Bird et al., Science (1988) 242: 423 ; Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879]. Schématiquement, les régions variables (environ 120 résidus) des chaînes lourdes et légères d'une Ig donnée sont clonées à partir de l'ARN messager de l'hybridome correspondant, par exemple en utilisant le kit RT-PCR distribué par Pharmacia (Mouse ScFv Module). Dans une seconde étape les régions variables sont génétiquement couplées par génie génétique par l'intermédiaire d'un peptide de liaison synthétique et par exemple le linker (GGGGS)<sub>3</sub>. Un fragment de restriction MstII-HindIII incluant le fragment Fv' d'une immunoglobuline sécrétée par un hybridome murin est donné à la Figure 14. La ligature du fragment HindIII-MstII du

plasmide pYG404 avec ce fragment MstII-HindIII permet de générer le fragment HindIII du plasmide pYG1382 qui code pour une protéine chimère dans laquelle la molécule de SAH est génétiquement couplée au fragment Fv' de la Figure 14 (chimère SAH-Fv'). Le clonage dans l'orientation productive du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1382 dans le site HindIII des plasmides pYG105 (LAC4) et pYG106 (PGK) génère les plasmides d'expression pYG1383 et pYG1384, respectivement.

#### E.10.2. Sécrétion des hybrides.

Après sélection sur milieu riche supplémenté en G418 les clones recombinants sont testés pour leur capacité à sécréter la forme mature de la protéine chimère SAH-Fv'. Quelques clones correspondant à la souche K. lactis CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1383 ou pYG1384 (SAH-Fv') sont mis à incuber en milieu liquide complet sélectif à 28°C. Les surnageants cellulaires sont alors testés après électrophorèse en gel d'acrylamide à 8.5 %, soit directement par coloration du gel au bleu de coomassie, soit après immunoblot en utilisant comme anticorps primaires un sérum polyclonal de lapin dirigé contre l'albumine humaine, ou directement incubée avec des anticorps biotinylés et dirigés contre les immunoglobulines d'origine murine. Les résultats de la Figure 15 démontrent que la protéine hybride SAH-Fv' est reconnue à la fois par des anticorps dirigés contre l'albumine humaine (panneau C) et réagit avec des anticorps de chèvre biotinylés immunologiquement réactifs à l'encontre d'immunoglobulines de souris (panneau B).

### EXEMPLE 11 : ACTIVITE BIOLOGIQUE DES CHIMERES

#### E.11.1. Activité biologique in vitro.

##### E.11.1.1. Chimères entre SAH et vWF.

L'activité antagoniste des produits est déterminée par mesure de l'inhibition dose-dépendante de l'agglutination des plaquettes humaines fixées au paraformaldéhyde selon la méthode décrite par Prior et al. [Bio/Technology (1992) 10: 66]. Les mesures se font dans un agrégamètre (PAP-4, Bio Data, Horsham, PA, USA) qui enregistre les variations au cours du temps de la transmission optique sous agitation à 37°C en présence de vWF, de botrocétine (8,2 mg/ml) et du produit à tester à différentes dilutions (concentrations). Pour chaque mesure, 400 ml (8x10<sup>7</sup> plaquettes) d'une suspension de plaquettes humaines stabilisées au paraformaldéhyde

(0,5 %, puis resuspendues en [NaCl (137 mM) ; MgCl<sub>2</sub> (1 mM) ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,36 mM) ; NaHCO<sub>3</sub> (10 mM) ; KCl (2,7 mM) ; glucose (5,6 mM) ; SAH (3,5 mg/ml) ; tampon HEPES (10 mM, pH 7,35)] sont préincubés à 37°C dans la cuve cylindrique (8,75 x 50 mm, Wellcome Distriwell, 159 rue Nationale, Paris) de l'agrégamètre pendant 4 min puis sont additionnés de 30 ml de la solution du produit à tester à différentes dilutions dans du véhicule de formulation apyrogène [mannitol (50 g/l) ; acide citrique (192 mg/l) ; L-lysine monochlorhydratée (182,6 mg/l) ; NaCl (88 mg/l) ; pH ajusté à 3,5 par addition de NaOH (1M)], ou de véhicule de formulation uniquement (essai contrôle). La suspension résultante est alors incubée pendant 1 min à 37°C et on ajoute 12,5 ml de vWF humain [American Bioproducts, Parsippany, NJ, USA; 11 % d'activité von Willebrand mesurée selon les recommandations d'utilisation du PAP-4 (Platelet Aggregation Profiler<sup>R</sup>) à l'aide de plaquettes fixées au formaldéhyde (2x10<sup>5</sup> plaquettes/ml), de plasma humain contenant de 0 à 100 % de vWF et de ristocétine (10 mg/ml, cf. p. 36-45 : vW Program<sup>TM</sup>] que l'on incube à 37°C pendant 1 min avant d'ajouter 12,5 ml de la solution de botrocétine [purifiée à partir de venin lyophilisé de Bothrops jararaca (Sigma), selon le protocole décrit par Sugimoto et al., Biochemistry (1991) 266: 18172]. L'enregistrement de la lecture de la transmission en fonction du temps est alors réalisée pendant 2 min sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté (Wellcome Distriwell) placé dans la cuve et sous une agitation magnétique de 1100 tr/min assurée par l'agrégamètre. La variation moyenne de la transmission optique (n<sup>35</sup> pour chaque dilution) au cours du temps est donc une mesure de l'agglutination plaquettaire due à la présence de vWF et de botrocétine, en l'absence ou en présence de concentrations variables du produit à tester. A partir de tels enregistrements, on détermine alors le % d'inhibition de l'agglutination plaquettaire due à chaque concentration de produit et on trace la droite donnant le % d'inhibition en fonction de l'inverse de la dilution de produit en échelle log-log. La CI<sub>50</sub> (ou concentration de produit provoquant 50 % d'inhibition de l'agglutination) est alors déterminée sur cette droite. Le Tableau de la Figure 16 compare les CI<sub>50</sub> de quelques unes des 30 chimères SAH-vWF de la présente invention et démontre que certaines d'entre elles sont de meilleurs antagonistes de l'agglutination plaquettaire que le produit RG12986 décrit par Prior et al. [Bio/Technology (1992) 10: 66] et inclus dans les essais à titre de valeur étonnant. Des tests identiques de l'inhibition de l'agglutination de plaquettes humaines en présence de vWF de plasma de porc (Sigma) permet en plus de

démontrer que certains des hybrides de la présente invention, et notamment certains variants de type IIB, sont de très bons antagonistes de l'agglutination plaquettaire en l'absence de co-facteurs de type botrocétine. L'antagonisme botrocétine-indépendant de ces chimères particulières peut également être démontré selon le protocole 5 initialement décrit par Ware et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. (1991) 88: 2946] par déplacement de l'anticorps monoclonal 125I-LJ-IB1 (10 mg/ml), un inhibiteur compétitif de la fixation du vWF sur la GPIb plaquettaire [Handa M. et al., (1986) J. Biol. Chem. 261: 12579] après 30 min d'incubation à 22°C en présence de plaquettes fraîches ( $10^8$  plaquettes/ml).

10 E.11.1.2. Chimères entre SAH et G-CSF.

Les chimères purifiées sont testées pour leur capacité à permettre la prolifération *in vitro* de la lignée murine IL3-dépendante NFS60, par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée essentiellement selon le protocole décrit par Tsuchiya et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. (1986) 83: 7633]. Pour chaque chimère, les 15 mesures sont réalisées entre 3 et 6 fois dans un test trois points (trois dilutions du produit) dans une zone où la relation entre quantité de produit actif et incorporation de thymidine marquée (Amersham) est linéaire. Dans chaque plaque de microtitration, l'activité d'un produit référence constitué de G-CSF humain recombinant exprimé dans des cellules mammifères est également systématiquement 20 incorporé. Les résultats de la Figure 17 démontrent que la chimère SAH-G-CSF (pYG1266) sécrétée par la levure *Kluyveromyces* et purifiée selon l'exemple E.9.3. est capable *in vitro* de transduire un signal de prolifération cellulaire pour la lignée NFS60. Dans ce cas particulier, l'activité spécifique (cpm/molarité) de la chimère est environ 7 fois plus faible que celle du G-CSF référence (non couplé).

25 E.11.2. Activité biologique *in vivo*.

L'activité de stimulation des chimères SAH/G-CSF sur la granulopoïèse *in vivo* est testée après injection sous-cutanée chez le rat (Sprague-Dawley/CD, 250-300 g, 8-9 semaines) et comparée à celle du G-CSF référence exprimé à partir de cellules de mammifère. Chaque produit, testé à raison de 7 animaux, est injecté par 30 voie sous-cutanée en région dorso-scapulaire à raison de 100 ml pendant 7 jours consécutifs (J1-J7). 500 ml de sang sont recueillis aux jours J-6, J2 (avant la 2<sup>ème</sup> injection), J5 (avant la 5<sup>ème</sup> injection) et J8, et une numération sanguine est effectuée. Dans ce test, l'activité spécifique (unités de neutropoïèse/mole injectée) de la chimère SAH-G-CSF (pYG1266) est identique à celle du G-CSF référence

(Figure 18). Puisque cette chimère particulière possède *in vitro* une activité spécifique 7 fois plus faible que celle du G-CSF référence (Figure 17), il est donc démontré que le couplage génétique du G-CSF sur la SAH en modifie favorablement les propriétés pharmacocinétiques.

## LISTE DE SEQUENCES

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 1859 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: double  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:  
(A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMPLACEMENT: 26..1855  
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Chimere de type SAH-Peptide"

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:  
(A) NOM/CLE: misc\_feature  
(B) EMPLACEMENT: 1842..1848  
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /standard\_name= "Site Mst II"

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 750 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: double  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:  
(A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMPLACEMENT: 3..746  
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Fragment C-ter de la chimere SAH-vWF470"

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 423 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: double  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

FEUILLE DE REMPLACEMENT

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:  
(A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMPLACEMENT: 3..419  
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Fragment C-ter de la chimere SAH-UK1-135"

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 541 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: double  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:  
(A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMPLACEMENT: 3..536  
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Fragment C-ter de la chimere SAH-G.CSF"

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 2455 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: double  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:  
(A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMPLACEMENT: 26..2389  
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Chimere G.CSF-Gly4-SAH en aval region prepro de SAN"

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:  
(A) NOM/CLE: misc\_recomb  
(B) EMPLACEMENT: 620..631  
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /standard\_name= "Linker PolyGly"

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:  
(A) NOM/CLE: misc\_feature  
(B) EMPLACEMENT: 706..111  
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /standard\_name= "Site Apa I"

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 756 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique

**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

(C) NOMBRE DE BRINS: double  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 3..752

(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Fragment C-ter de la chimere SAH-Fv"

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: misc\_recomb

(B) EMPLACEMENT: 384..428

(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /standard\_name= "Linker synthetique"

REVENDICATIONS

1. Polypeptide recombinant comportant une partie active dérivée d'un polypeptide ayant une activité thérapeutique, génétiquement couplée à une albumine ou à un variant de l'albumine.
- 5 2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce que le polypeptide ayant une activité thérapeutique est un polypeptide d'origine humaine.
- 10 3. Polypeptide selon la revendication 2 caractérisé en ce que le polypeptide ayant une activité thérapeutique est choisi parmi tout ou partie des enzymes, des inhibiteurs d'enzymes, des antigènes, des anticorps, des hormones, des facteurs de la coagulation, des interférons, des cytokines, des facteurs de croissance et/ou de différenciation, des facteurs impliqués dans la génèse/résorption des tissus osseux, des facteurs chimiотactiques, des facteurs de motilité ou de migration cellulaire, des facteurs cytostatiques, des facteurs bactéricides ou antifongiques, ou des molécules adhésives plasmatiques, interstitielles ou des matrices extracellulaires.
- 15 4. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que le polypeptide ayant une activité thérapeutique est choisi parmi toute séquence peptidique antagoniste ou agoniste d'interactions moléculaires et/ou cellulaires impliquées dans les pathologies des compartiments circulatoires et interstitiels.
- 20 5. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la partie active présente une structure choisie parmi :
  - (a) la structure peptidique entière ou,
  - (b) un fragment de (a) ou une structure dérivée de (a) par modification structurale (mutation, substitution addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus) et conservant une activité thérapeutique.
- 25 6. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la partie active est couplée à l'extrémité N-terminale de l'albumine.
7. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la partie active est couplée à l'extrémité C-terminale de l'albumine.

8. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que la partie active y est représenté plusieurs fois.

9. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

5 10. Séquence nucléotidique selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence "leader" permettant la sécrétion du polypeptide exprimé.

10 11. Cassette d'expression comprenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 9 ou 10 sous le contrôle d'une région d'initiation de la transcription et éventuellement d'une région de terminaison de la transcription.

12. Plasmide autoréplicatif comportant une cassette d'expression selon la revendication 11.

15 13. Cellule recombinante eucaryote ou procaryote dans laquelle a été inséré une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 9 ou 10 ou une cassette d'expression selon la revendication 11 ou un plasmide selon la revendication 12.

14. Cellule recombinante selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure, d'une cellule animale, d'un champignon ou d'une bactérie.

15. Cellule recombinante selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure.

20 16. Cellule recombinante selon la revendication 15 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure du genre Saccharomyces ou Kluyveromyces.

25 17. Procédé de préparation d'un polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinante selon l'une des revendications 13 à 16 dans des conditions d'expression, et on récupère le polypeptide produit.

18. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

19. Composition pharmaceutique comprenant une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11 utilisable en thérapie génique.

Figure 1A

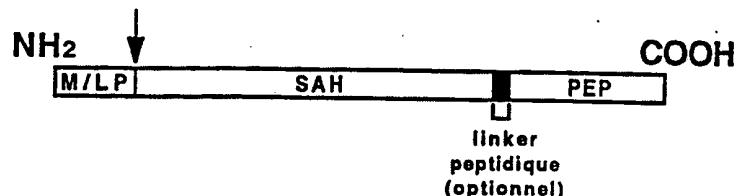


Figure 1B

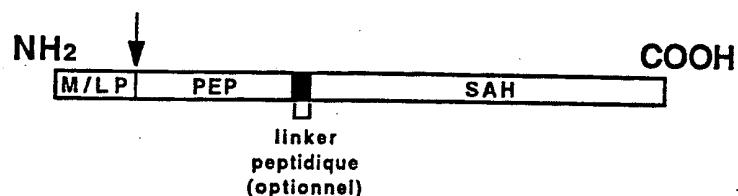


Figure 1C

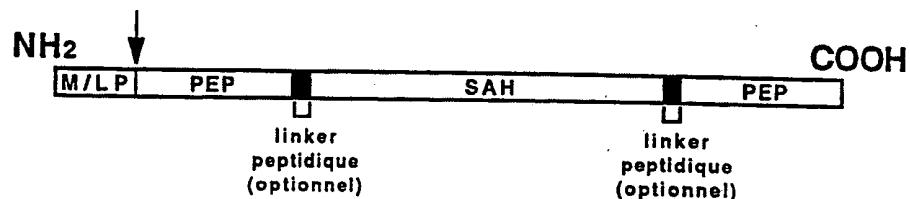


Figure 1

FEUILLE DE REMplacement

SEQ. ID NO.: 1

AAGCT TTACAAACAAA TATAAAAACA ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT CTC TTT  
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe

-12

AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT  
 Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His

9

CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG  
 Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln

29

TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT  
 Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe

49

GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT  
 Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu

69

TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTC ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC  
 Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp

89

TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC  
 Cys Cys Ala Lys Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn

109

CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC  
 Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp

129

AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT  
 Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe

149

TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC  
 Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys

169

CAA GCT GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG  
 Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly

189

AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA  
 Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg

209

GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA  
 Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala

229

GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT  
 Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp

249

Figure 2(a)

FEUILLE DE REMplacement

CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT  
Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp 269

TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC.  
Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys 289

ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT  
Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe 309

GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG  
Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met 329

TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTA CTG CTG CTG AGA CTT  
Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Arg Leu 349

GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC  
Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys 369

TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA  
Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys 389

CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT  
Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val 409

CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC  
Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn 429

CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA  
Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala 449

GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA  
Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val 469

AGT GAC AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA  
Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser 489

GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC  
Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe 509

CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT  
His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu 529

GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT  
Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp 549

GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC  
Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala 569

Met II  
GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA (NNN)p TAA GCTT  
Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu (X)p \*\*\*  
PEPTIDE

Figure 2(b)

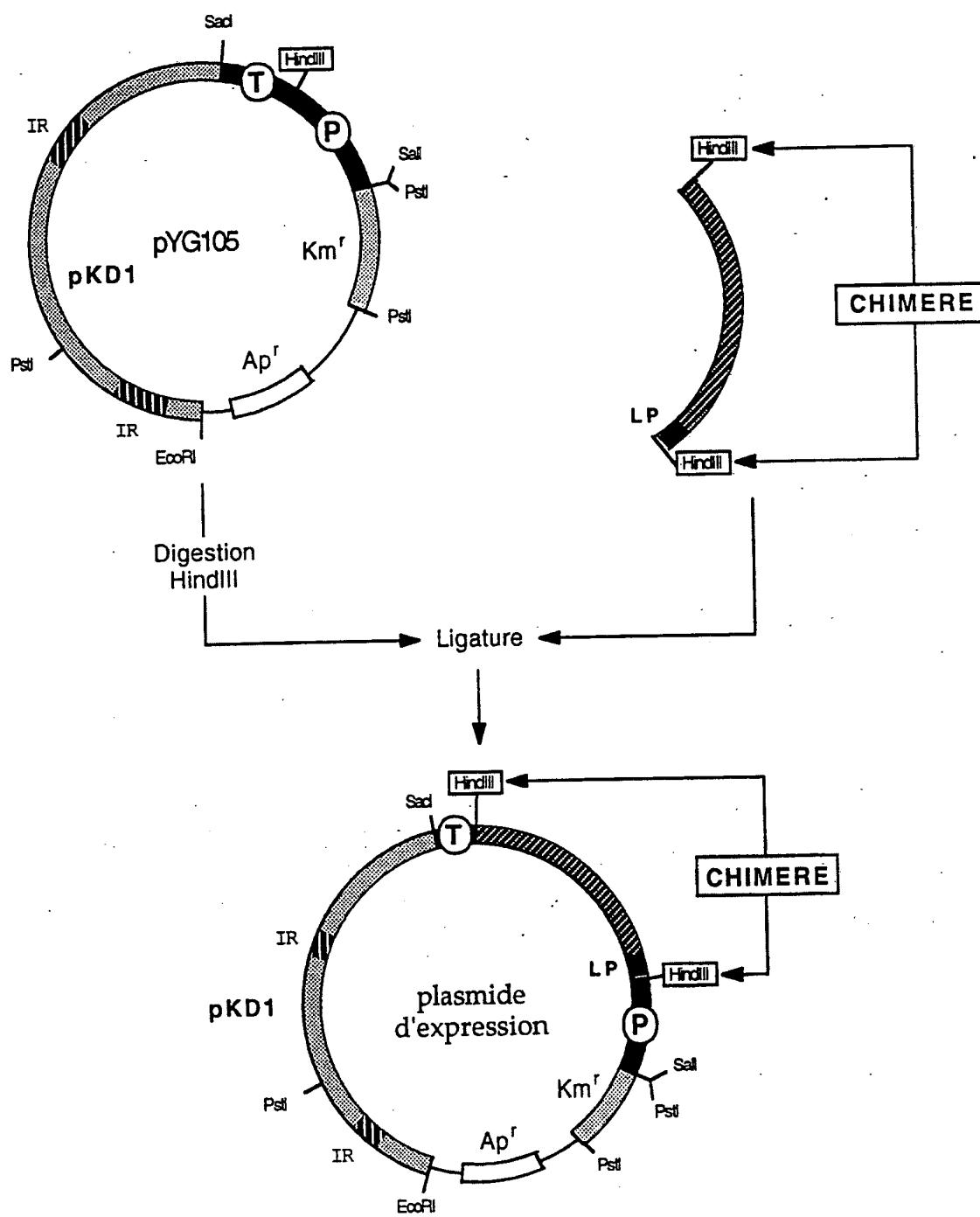


Figure 3

Figure 4A

CC TTA GGC TTA (NNN) 244 TAA GCTT  
Leu Gly Leu (Thr470->Val713) \*\*\*

Figure 4B

CC TTA GGC TTA (NNN) 29 TAA GCTT  
Leu Gly Leu (Thr470->Asp498) \*\*\*

Figure 4C

CC TTA GGC CTC (NNN) 14 TAA GCTT  
Leu Gly Leu (Cys695->Pro708) \*\*\*  
<----- D5 ----->

Figure 4D

CC TTA GGC TTA (NNN) 90 TAA GCTT  
Leu Gly Leu (Thr470->Tyr508, Arg663->Val713) \*\*\*

Figure 4 (A à D)

SEQ. ID NO.: 2

CC TTA GGC TTA ACC TGT GAA GCC TGC CAG GAG CCG GGA GGC CTG GTG GTG CCT CCC ACA  
Leu Gly Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr 601  
SAH<----I--->vWF470->713

GAT GCC CCG GTG AGC CCC ACC ACT CTG TAT GTG GAG GAC ATC TCG GAA CCG CCG TTG CAC  
Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His 621

GAT TTC TAC TGC AGC AGG CTA CTG GAC CTG GTC TTC CTG CTG GAT GGC TCC TCC AGG CTG  
Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu 641

TCC GAG GCT GAG TTT GAA GTG CTG AAG GCC TTT GTG GTG GAC ATG ATG GAG CGG CTG CGC  
Ser Glu Ala Glu Phe Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg 661

ATC TCC CAG AAG TGG GTC CGC GTG GCC GTG GAG TAC CAC GAC GGC TCC CAC GCC TAC  
Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp Gly Ser His Ala Tyr 681

ATC GGG CTC AAG GAC CGG AAG CGA CCG TCA GAG CTG CGG CGC ATT GCC AGC CAG GTG AAG  
Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys 701

TAT GCG GGC AGC CAG GTG GCC TCC ACC AGC GAG GTC TTG AAA TAC ACA CTG TTC CAA ATC  
Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile 721

TTC AGC AAG ATC GAC CGC CCT GAA GCC TCC CGC ATC GCC CTG CTC CTG ATG GCC AGC CAG  
Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Leu Met Ala Ser Gln 741

GAG CCC CAA CGG ATG TCC CGG AAC TTT GTC CGC TAC GTC CAG GGC CTG AAG AAG AAG AAG  
Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys 761

GTC ATT GTG ATC CCG GTG GGC ATT GGG CCC CAT GCC AAC CTC AAG CAG ATC CGC CTC ATC  
Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile 781

GAG AAG CAG GCC CCT GAG AAC AAG GCC TTC GTG CTG AGC AGT GTG GAT GAG CTG GAG CAG  
Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln 801

CAA AGG GAC GAG ATC GTT AGC TAC CTC TGT GAC CTT GCC CCT GAA GCC CCT CCT CCT ACT  
Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr 821

CTG CCC CGC ATG GCA CAA GTC TAA GCTT  
Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val \*\*\* 829

Figure 4 (E)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

7/21

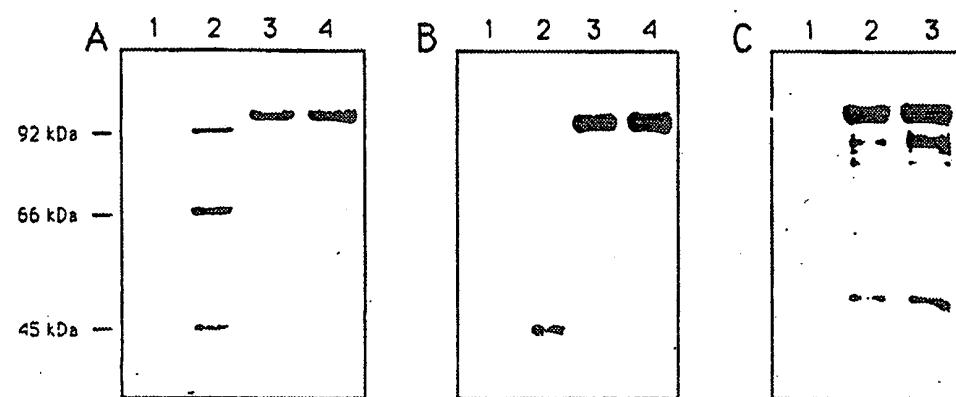


Figure 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT

8/21

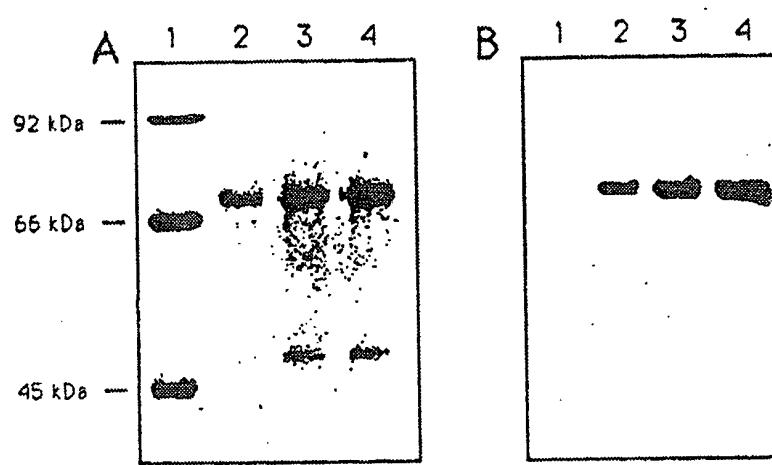


Figure 6

FEUILLE DE REMPLACEMENT

9/21

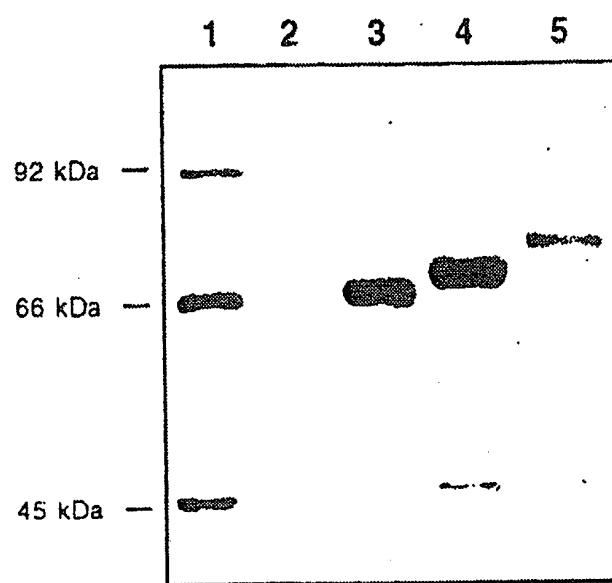


Figure 7

FEUILLE DE REMPLACEMENT

SEQ. ID NO.: 3

CC TTA GGC TTA AGC AAT GAA CTT CAT CAA GTT CCA TCG AAC TGT GAC TGT CTA AAT GGA Leu Gly Leu Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp Cys Leu Asn Gly SAH<----I---->UK	601
GGA ACA TGT GTG TCC AAC AAG TAC TTC TCC AAC ATT CAC TGG TGC AAC TGC CCA AAG AAA Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys	621
TTC GGA GGG CAG CAC TGT GAA ATA GAT AAG TCA AAA ACC TGC TAT GAG GGG AAT GGT CAC Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His EGF-LIKE<----I---->KRINGLE	641
TTT TAC CGA GGA AAG GCC AGC ACT GAC ACC ATG GGC CGG CCC TGC CTG CCC TGG AAC TCT Phe Tyr Arg Gly Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser	661
GCC ACT GTC CTT CAG CAA ACG TAC CAT GCC CAC AGA TCT GAT GCT CTT CAG CTG GGC CTG Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu Gln Leu Gly Leu	681
GGG AAA CAT AAT TAC TGC AGG AAC CCA GAC AAC CGG AGG CGA CCC TGG TGC TAT GTG CAG Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln	701
GTG GGC CTA AAG CCG CTT GTC CAA GAG TGC ATG GTG CAT GAC TGC GCA GAT GGA AAA TAA Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln Glu Cys Met Val His Asp Cys Ala Asp Gly Lys ***	720

GCTT

Figure 8

11/21

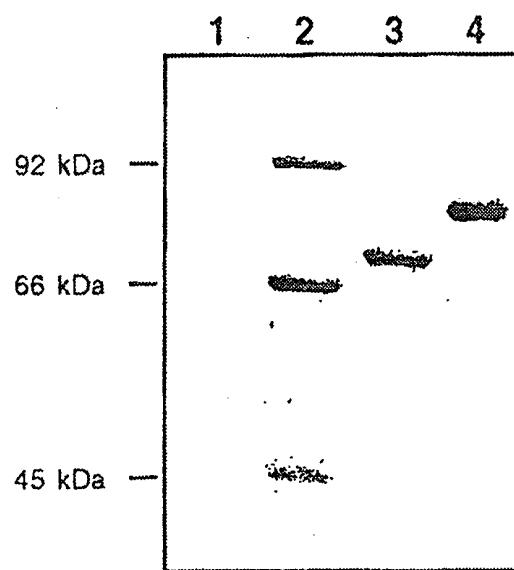


Figure 9

FEUILLE DE REMPLACEMENT

SEQ. ID NO.: 4

## ApaI

CC TTA GGC TTA ACC CCC CTG GGC CCT GCC AGC TCC CTG CCC CAG AGC TTC CTG CTC AAG  
 Leu Gly Leu Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys 601  
 SAH<---I--->G-CSF

TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GCC GCA GCG CTC CAG GAG AAG CTG TGT  
 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys 621

GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG GTG CTG CTC GGA CAC TCT CTG CCC ATC  
 Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Gly His Ser Leu Gly Ile 641

## SstI

CCC TGG GCT CCC CTG ACC TCC TGC CCC AGC CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC  
 Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser 661

CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG CAG GCC CTG GAA GGG ATA TCC  
 Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser 681

CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC  
 Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr 701

ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC  
 Ile Trp Gln Gln Met Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala 721

ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGC CGG GCA GGA GGG GTC CTG GTT GCT AGC CAT  
 Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His 741

CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCG CAG CCC TGA AGCTT  
 Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro \*\*\* 759

Figure 10

FEUILLE DE REMplacement

SEQ. ID NO.: 5

AAGCT TTACAAACAAA TATAAAAACA ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT CTC TTT Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe	-12
AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA ACC CCC CTG GGC CCT GCC AGC TCC CTG Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu I---->G-CSF	9
CCC CAG AGC TTC CTG CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala	29
GCG CTC CAG GAG AAG CTG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG GTG CTG Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu SstI	49
CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC TCC TGC CCC AGC CAG GCC CTG Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu	69
CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu	89
CAG GCC CTG GAA GGG ATA TCC CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp	109
GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala	129
CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGC CGG GCA GGA Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly	149
GGG GTC CTG GTT GCT AGC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC CGC GTT CTA CGC Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg	169
CAC CTT CGC CAG CCC GGT GGA GGC GGT GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT CCT CAT CGG TTT His Leu Ala Gln Pro Gly Gly Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe G-CSF<--I linker I-->SAH	189
AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT Lys Asp Leu Gly Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu	209
CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA AAA Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys	229
ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly	249
GAC AAA TTA TGC ACA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys	269
GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA TCC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn	289
CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu	309
GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC Glu Thr Phe Leu Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala	329

Figure 11 (a)

**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT  
 Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala 347  
  
 GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT  
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala 369  
  
 TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC  
 Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe 389  
  
 AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT  
 Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val 409  
  
 TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT  
 Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu 429  
  
 GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT TCG ATC  
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile 449  
  
 TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC ATT GCC  
 Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala 469  
  
 GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA  
 Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Asp Phe Val Glu 489  
  
 AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG  
 Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu 509  
  
 TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTA CTG CTG AGA CTT GCC AAG  
 Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Arg Leu Ala Lys 529  
  
 ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT CCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC  
 Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala 549  
  
 AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAT  
 Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn 569  
  
 TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC  
 Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr 589  
  
 ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA  
 Thr Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly 609  
  
 AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC  
 Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp 629  
  
 TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC  
 Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp 649  
  
 AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG  
 Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu 669  
  
 GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA  
 Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala 689  
  
 GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG  
 Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu 709  
  
 CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC  
 Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe 729  
  
 GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG  
 Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu 749  
  
 MetII  
 GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA CATCACATTT  
 Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu \*\*\* 763  
  
 AAAAGCATCT CAGCCTACCA TGAGAATAAG AGAAAGAAAA TGAAGATCAA AAGCTT

Figure 11 (b)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

15/21

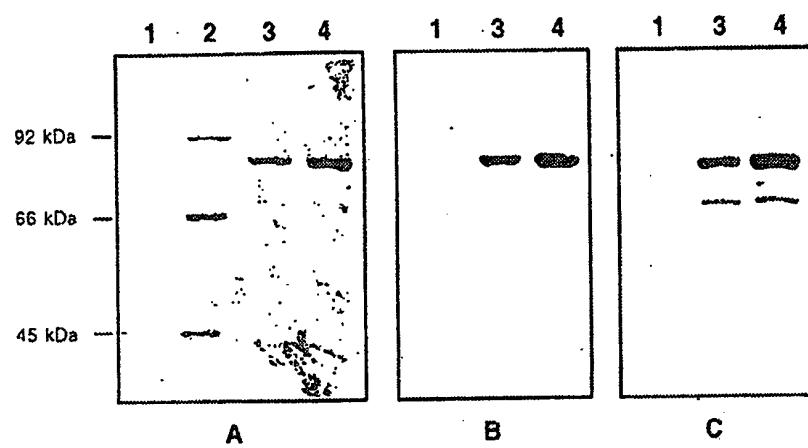


Figure 12

FEUILLE DE REMplacement

16/21

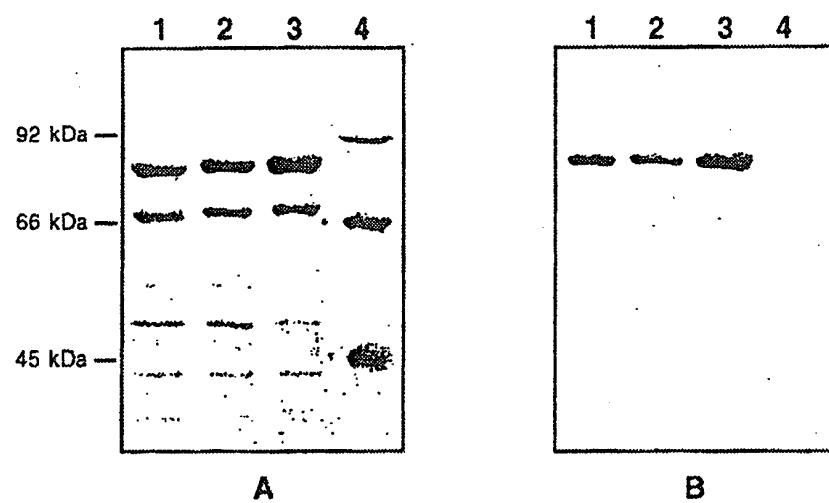


Figure 13

FEUILLE DE REMPLACEMENT

SEQ. ID NO.: 6

CC TTA GGC TTA CAG GTG CAG CTC GAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC  
 Leu Gly Leu Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala 601  
 SAH<---I--->VH

TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC GCA TTC AGT AGG TCT TGG ATG AAC TGG  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn Trp 621

GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CGG ATT TAT CCT GGA GAT GGA  
 Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly 641

GAT ACC AAA TAC AAT GGG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCG GAC AGA TCA TCC  
 Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser 661

AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GTG GGC TCT GCG GTC TAT TTC TGT  
 Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Gly Ser Ala Val Tyr Phe Cys 681

GCA AAA GAG AAC AAT AGG TTC GAC GAG AGG GGT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA  
 Ala Lys Glu Asn Asn Arg Phe Asp Glu Arg Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln 701

GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GTC GGC  
Gly Thr Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly 721  
VH<---I linker synthetique

GGC GGA TCT AAC ATT CAG TTG ACC CAG TCT CCA AAT TCC ATG TCC ACA TCA GTC GGA GAC  
Gly Gly Ser Asn Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asn Ser Met Ser Thr Ser Val Gly Asp  
I--->VL 741

AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG GCC AGT CAG GAT GTG GAT ACT TCT GTC GCA GCC TGG TAT CAA  
 Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Val Ala Trp Tyr Gln 761

CAG AAA CCA GGG CAA TCT CCT AAA CTA CTG ATT TAC TGG GCA TCC ACC CGG CAC ACT GGA  
 Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly 781

GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATT ACC AAT  
 Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn 801

GTG CAG TCT GAA GAC TCG GCA GAT TAT TTC TGT CAG CAA TAT AGC AGC TAT CCG TGG ACG  
 Val Gln Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr 821

TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA TAA GCTT  
 Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys \*\*\* 831

18/21

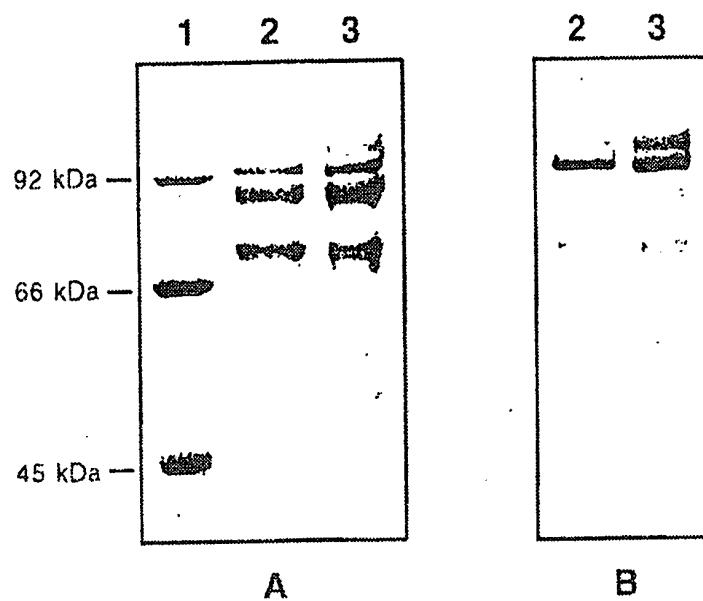


Figure 15

FEUILLE DE REMPLACEMENT

19/21

PRODUIT	Cl <sub>50</sub> (nM)
RG12986	50
SAH-vWF <sub>694-708</sub>	50000
SAH-vWF <sub>C471,474-&gt;G</sub> <sup>470-713</sup>	20
SAH-vWF <sub>C471,474-&gt;G</sub> <sup>470-704</sup>	<10

Figure 16

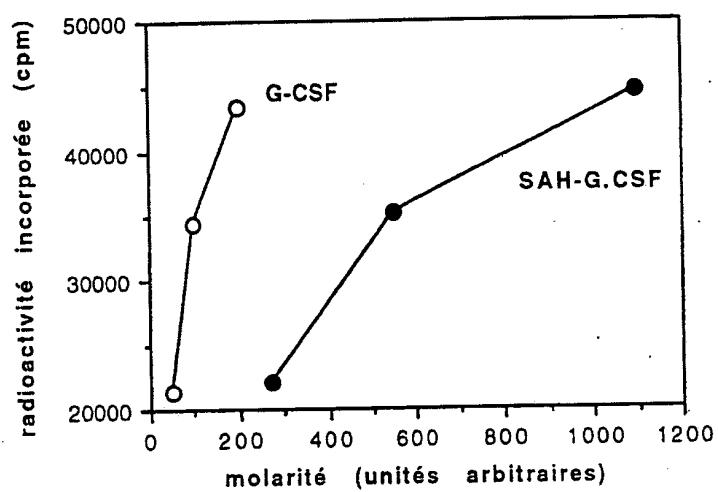


Figure 17

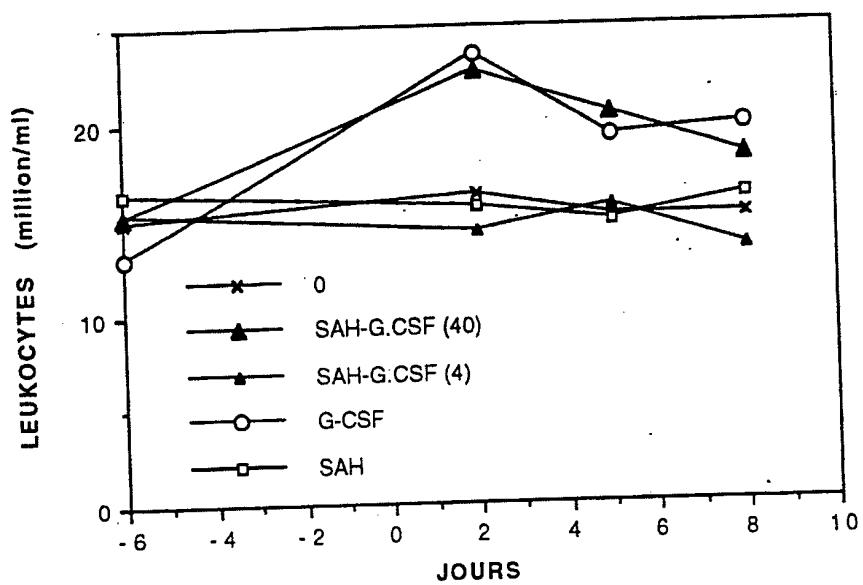


Figure 18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00085

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5: C12N 15/12; C12N 15/62; C12N 15/81; C12P 21/02  
 C07K 13/00; A61K 37/02; C12N 1/19; // (C12N 1/19, R1:85).

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5: C12N; C12P; C07K; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, A, 9 013 653 (DELTA BIOTECHNOLOGY LIMITED) 15 November 1990, see page 11, paragraph 3 - page 12, paragraph 2; claims 1-7 ---	1-5,7,9-18
X	WO, A, 8 902 922 (GENENTECH, INC.) 6 April 1989, see claims 1,2,5,8,12,17 see claims 24,25,41,44 ---	1,2,5,6,9,10, 17,18
X	EP, A, 0 413 622 (RHONE-POULENC SANTE) 20 February 1991, see claims 1-29 ---	1,2,5,7-18
Y	DATABASE WPIL Section Ch, Week 9141, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C, AN 91-300976 & JP, A, 3 201 987 (TONEN CORP) 3 September 1991, see abstract ---	1-19
P, Y	WO, A, 9 300 437 (RHONE-POULENC RORER S.A.) 7 January 1993, see claims 25,26; figures 14,15 -----	1-19

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 June 1993 (18.06.93)Date of mailing of the international search report  
2 July 1993 (02.07.93)Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9300085  
SA 70239

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 18/06/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9013653	15-11-90	AU-B-	630450	29-10-92
		AU-A-	5564690	29-11-90
		EP-A-	0470165	12-02-92
		GB-A, B	2246783	12-02-92
		JP-T-	4506598	19-11-92
WO-A-8902922	06-04-89	None		
EP-A-0413622	20-02-91	FR-A-	2650598	08-02-91
		CA-A-	2022539	04-02-91
		JP-A-	3178998	02-08-91
WO-A-9300437	07-01-93	FR-A-	2677996	24-12-92
		AU-A-	2148192	25-01-93
		EP-A-	0519829	23-12-92

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00085

## I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ?

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12N15/12; C07K13/00;	C12N15/62; A61K37/02;	C12N15/81; C12N1/19;	C12P21/02 //(C12N1/19, R1:85)
--------------------------------	--------------------------	-------------------------	----------------------------------

## II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée<sup>8</sup>

Système de classification	Symboles de classification		
CIB 5	C12N ;	C12P ;	C07K ; A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS<sup>10</sup>

Catégorie <sup>9</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire <sup>12</sup> des passages pertinents	No. des revendications visées <sup>14</sup>
X	WO,A,9 013 653 (DELTA BIOTECHNOLOGY LIMITED) 15 Novembre 1990 voir page 11, alinéa 3 - page 12, alinéa 2; revendications 1-7 ---	1-5,7, 9-18
X	WO,A,8 902 922 (GENENTECH, INC.) 6 Avril 1989 voir revendications 1,2,5,8,12,17 voir revendications 24,25,41,44 ---	1,2,5,6, 9,10,17, 18
X	EP,A,0 413 622 (RHONE-POULENC SANTE) 20 Février 1991 voir revendications 1-29 ---	1,2,5, 7-18 -/-

<sup>9</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup>

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

## IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  18 JUIN 1993	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  02 -07- 1993
Administration chargée de la recherche internationale  OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé  HORNIG H.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie <sup>15</sup>	Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
Y	<p>DATABASE WPIL</p> <p>Section Ch, Week 9141, Derwent Publications Ltd., London, GB;</p> <p>Class C, AN 91-300976 &amp; JP,A,3 201 987 (TONEN CORP) 3 Septembre 1991 voir abrégé</p> <p>---</p>	1-19
P,Y	<p>WO,A,9 300 437 (RHONE-POULENC RORER S.A.) 7 Janvier 1993</p> <p>voir revendications 25,26; figures 14,15</p> <p>-----</p>	1-19

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9300085  
SA 70239

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

18/06/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9013653	15-11-90	AU-B- 630450 AU-A- 5564690 EP-A- 0470165 GB-A, B 2246783 JP-T- 4506598	29-10-92 29-11-90 12-02-92 12-02-92 19-11-92
WO-A-8902922	06-04-89	Aucun	
EP-A-0413622	20-02-91	FR-A- 2650598 CA-A- 2022539 JP-A- 3178998	08-02-91 04-02-91 02-08-91
WO-A-9300437	07-01-93	FR-A- 2677996 AU-A- 2148192 EP-A- 0519829	24-12-92 25-01-93 23-12-92

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**  
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.